

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESCUELA PROFESIONAL DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA**

**Aislamiento y selección de rizobacterias del género
Azotobacter y *Bacillus* con potencial aplicación como
bioinoculante en el cultivo de *Mangifera indica* L (mango)**

TESIS

**Para optar el Grado Académico de Bachiller en Microbiología y
Parasitología**

AUTOR

Liz Pamela JARAMILLO CALLE

ASESOR

Jorge LEÓN QUISPE

Lima - Perú

2012

*Dedico esta tesis a mi abuelo Braulio Calle por enseñarme a amar la naturaleza, a
mi tío Salvio Jaramillo por ser un ejemplo a seguir,
a mi madre por su amor y ánimo en momentos difíciles,
a mis padres por su apoyo,
y a todas y cada una de las personas que hagan investigación en busca de la
mejora y desarrollo de la agricultura de nuestro país.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la vida por todas y cada una de las oportunidades que permitieron hacer este trabajo.

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor De San Marcos, por financiar este trabajo de tesis.

A mi asesor el Mg. Jorge León Quispe, por su paciencia, cariño y consejos.

A mis profesores por sus enseñanzas, sugerencias y llamadas de atención sin las cuales no se hubiera logrado terminar esta tesis.

A mi madre por su amor, paciencia e insistencia en que haga las cosas lo mejor posible, y por animarme a dar siempre lo mejor de mí y trabajar hasta agotar el último esfuerzo.

A mi papá Rigoberto por su entusiasmo, ánimo, paciencia y predisposición para trabajar y buscar lo necesario para la toma de muestras y el trabajo de campo.

A mi papá Ceste por su apoyo y la insistencia para que realice estudios en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

A mis hermanos Alissa y Jesús, en especial a Jesús por sus travesuras y ocurrencias que hicieron alegrar mis momentos tristes y difíciles.

A mis tíos Betty y Wily por su ayuda y consejos.

A mi querida amiga y colega Stephanie Montero Trujillo, por sus consejos técnicos e infinita paciencia.

Al Sr. Herli Yovera por su apoyo y acceso al vivero “El Huerto”, así mismo a todo el personal que labora en esta institución.

A todos mis amigos, en especial a las Srtas. Jackelin Paredes Ramos y Karina Faustino Meza por su ayuda y alegría.

A todo el personal que labora en la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial al Sr. Armando Alvarado Domínguez, por su predisposición a quedarse “5 minutitos más” del horario de atención y así permitirme acabar con lo programado.

INDICE GENERAL

I. RESUMEN/ ABSTRACT	1
II. INTRODUCCION	5
III. MARCO TEORICO	
3.1 El mango (<i>Mangifera indica</i> L)	7
3.2 La planta de mango	7
3.3 El cultivo de mango	9
3.4 Importancia económica del mango	12
3.5 Mango Orgánico	12
3.6 Principales enfermedades del cultivo de Mango	14
3.7 Rizósfera	14
3.8 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)	15
3.9 Capacidades Promotoras del Crecimiento Vegetal	17
3.9.1 Antagonismo y control biológico de fitopatógenos	17
3.9.2 Solubilización de Fosfatos	18
3.9.3 Producción de Acido Indol Acético	18
3.9.4 Fijación de Nitrógeno	19
3.10 Características del género <i>Bacillus</i>	20
3.11 Características del género <i>Azotobacter</i>	22
IV. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo General	24
4.2 Objetivos Específicos	24
V. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1 MATERIAL	25
5.2 MÉTODOS	25
5.2.1 Lugar y toma de muestras de rizósfera	25
5.2.2 Tratamiento de las muestras	26
5.2.3 Aislamiento e identificación del género <i>Bacillus</i>	26

5.2.4 Aislamiento e identificación del género <i>Azotobacter</i>	26
5.2.5 Comportamiento cultural de las cepas de <i>Bacillus</i> y <i>Azotobacter</i> aisladas.	27
5.2.5.1 Crecimiento a diferentes temperaturas	27
5.2.5.2 Crecimiento a diferente pH	27
5.2.6 Pruebas para capacidades promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) <i>in Vitro</i>	28
5.2.6.1 Prueba de antagonismo	28
5.2.6.2 Solubilización de fosfatos	29
5.2.6.3 Prueba de la producción de Ácido Indol Acético (AIA)	29
5.2.6.4 Prueba de Capacidad Potencial de Fijación de Nitrógeno	29
5.2.7 Selección de cepas con mejores resultados para el diseño de los tipos de bioinoculantes	30
5.2.8 Evaluación de los diferentes tipos de bioinoculantes a nivel de almácigo	30
5.2.9 Diseño y análisis estadístico	31

VI. RESULTADOS

6.1 Características generales del lugar de muestreo	32
6.2 Aislamiento e identificación del género <i>Bacillus</i>	32
6.3 Aislamiento e identificación del género <i>Azotobacter</i>	32
6.4 Comportamiento cultural de las cepas de <i>Bacillus</i> y <i>Azotobacter</i> aisladas	33
6.4.1 Crecimiento a diferentes temperaturas	33
6.4.2 Crecimiento a diferente pH	33

6.5 Pruebas para capacidades promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) <i>in Vitro</i>	33
6.5.1 Prueba de antagonismo	33
6.5.2 Solubilización de fosfatos	35
6.5.3 Prueba de la producción de Ácido Indol Acético (AIA)	35
6.5.4 Prueba de Capacidad Potencial de Fijación de Nitrógeno	35
6.5.5 Selección de cepas con mejores resultados para el diseño de los tipos de bioinoculantes	36
6.5.6 Evaluación de los diferentes tipos de bioinoculantes a nivel de almácigo	36
VII. DISCUSION	38
VIII. CONCLUSIONES	46
IX. RECOMENDACIONES	47
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	48
XI. ANEXOS	
ANEXO 1. Tablas	61
ANEXO 2. Figuras	80
ANEXO 3. Medios de cultivo utilizados	86

ABREVIATURAS

AAG	Agar Ashby Glucosa
AN	Agar Nutricio
APD	Agar Papa Dextrosa
APEM	Asociación Peruana de Productores y Exportadores de Mango.
CMSN	Caldo Mineral sin Nitrógeno
FAOSTAT	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Base estadística de producción mundial y rendimiento.
FTA	Fondo de Tecnología Agraria.
HPA	Health Protection Agency
NFB	Nitrogen Free Broth
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PICR	Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Agraria.
TSA	Agar Trypticase de Soya
TSB	Trypticase Soy Broth
UNMSM	Universidad Nacional Mayor de San Marcos

I. RESUMEN

El Mango (*Mangifera indica* L), es uno de los productos bandera de exportación a nivel nacional que actualmente está dirigiendo su producción al rubro de productos orgánicos; sin embargo, su producción se ve afectada por hongos fitopatógenos y deficiencia de nutrientes en forma orgánica, es por ello que existe la necesidad de contar con bioinoculantes.

El objetivo del presente trabajo fue aislar y seleccionar rizobacterias del género *Azotobacter* y *Bacillus* con potencial aplicación como bioinoculante en el cultivo de *Mangifera indica* L (mango). El aislamiento se realizó a partir de muestras de rizósfera de plantaciones de mango del departamento de Piura. Se logró aislar 23 cepas del género *Bacillus*, de las cuales, 8 (34,8%) presentaron antagonismo antifúngico frente a *Lasiodiplodia theobromae*, 7 (30,4%) frente a *Colletotrichum gloeosporioides* y 1 (4,3 %) frente a *Phytophthora* sp. Asimismo 6 (26,1 %) fueron antagonistas tanto a *Fusarium* sp. como a *Alternaria* sp. En el caso de *Azotobacter* de las 29 cepas aisladas, 5 (17,2 %) presentaron antagonismo antifúngico frente a *Lasiodiplodia teobromae* y *Phytophthora* sp., 6 (20,7 %) frente a *Colletotrichum gloeosporioides*, 12 (41,4 %) frente a *Fusarium* sp. y 11 (37,9 %) frente a *Alternaria* sp. Por otro lado 7 (30,4%) de las cepas de *Bacillus* sp y 18 (62,1 %) de las cepas de *Azotobacter* sp presentaron capacidad solubilizadora de fosfatos. El 39,1% (9) de *Bacillus* sp y el 65,5 % (19) de *Azotobacter* sp lograron producir ácido indol acético (AIA). En ambos géneros el 100% presentó capacidad potencial de fijación de nitrógeno.

Se realizaron pruebas a nivel de almácigo con 7 cepas del género *Bacillus* y 5 del género *Azotobacter* seleccionadas para uso como potenciales bioinoculantes debido a que presentaron los mejores resultados en las pruebas anteriores. Se observó que todas las cepas usadas tuvieron efecto positivo en cuanto a la

reducción del tiempo de germinación, incremento en la altura de tallo y número de hojas y ausencia de síntomas de micosis.

Se demuestra de esta forma que la rizósfera del cultivo de mango presenta bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus* con potencial aplicación como bioinoculante para la mejora de la producción de mango orgánico.

Palabras clave: rizósfera, rizobacterias, micosis, hongos fitopatógenos, antifúngico, bioinoculante.

I. ABSTRACT

The Mango fruit (*Mangifera indica* L), is one of the most important products of national exportation, nowadays its production has been directed towards organic products branch; nevertheless the production has been affected by phythopatogenic fungi and deficiencies in organic nutrients, that's why exists the necessity of having bioinoculants. The objective of this study was to isolate and select rhizobacteria of the genus *Azotobacter* sp. and *Bacillus* sp. with potential application as bioinoculant in the cultivation of *Mangifera indica* L (mango). The isolation was performed since rhizosphere samples, taken from mango plantations of Piura. It could be possible to isolate 23 strains from *Bacillus* genus, from which, 8 (34,8%) had antifungal antagonism to *Lasiodiplodia theobromae*, 7 (30,4%) to *Colletotrichum gloeosporioides* y 1 (4,3 %) to *Phytophthora* sp. Also 6 (26,1%) were antagonists to *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp. In the case of *Azotobacter*, 5 (17,2%) from the 29 isolated strains, had antifungal antagonism to *Lasiodiplodia teobromae* and *Phytophthora* sp., 6 (20,7%) to *Colletotrichum gloeosporioides*, 12 (41,4 %) to *Fusarium* sp. and 11 (37,9 %) to *Alternaria* sp. In the other hand 7 (30,4%) *Bacillus* and 18 (62,1 %) *Azotobacter* sp strains had phosphate solubilizing activity. 39,1% (9) of *Bacillus* and 65,5 % (19) of *Azotobacter* could produce indoleacetic acid (IAA). In both genus the 100% had potential capacity of nitrogen fixation.

The bacterial strains; 7 from the *Bacillus* genus and 5 from *Azotobacter* were selected as potential bioinoculants in the assays before mentioned, these were tested in seedbeds. All of these strains had a positive effect in the reduction of the germination time, increase in the stem height, number of leaves and absence of mycosis symptoms.

It is demonstrated that mango rhizosphere had bacteria from the genus *Azotobacter* and *Bacillus* with potential application as bioinoculant for the optimization in the production of organic mango.

Keywords: rhizosphere, rizhobacteria, mycosis, fungus phythopatogenics, antifungal, bioinoculant.

II. INTRODUCCION

En los últimos años el uso y abuso de productos químicos en la agricultura ha generado grandes niveles de contaminación de los suelos agrícolas, causando un deterioro y empobrecimiento de los mismos, lo que ha dado como resultado la disminución de la producción de alimentos, mientras que la población humana y su interés por consumir productos sanos y libres de residuos químicos aumenta cada vez más.

Una de las tecnologías que actualmente se viene implementando en la agricultura moderna es la aplicación de bioinoculantes, un producto 100% biológico, hecho a base de microorganismos que cumplen la función de biofertilizantes y biocontroladores. Esta tecnología conocida también como agricultura ecológica se basa en el uso de microorganismos de suelos y la rizósfera con capacidad promotora de crecimiento vegetal y con propiedades antagonistas para el control de fitopatógenos (González, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2004; Carrillo *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007); la cual resulta una alternativa sustentable en la generación de sistemas de producción agrícola amigables con la salud del consumidor y el medio ambiente (Serrano y Galindo, 2007).

Uno de los productos bandera de exportación a nivel nacional es el Mango (*Mangifera indica* L). La producción nacional de mango está centralizada en la costa norte, siendo Piura el departamento con mayor producción y superficie cultivada; pues los valles de San Lorenzo, Chulucanas, Tambo Grande y Sullana concentran cerca del 70% de la producción nacional, y actualmente se enfrenta a las exigencias del mercado internacional que demanda mayor producción. Sin embargo la producción de mango se ve afectada por hongos fitopatógenos que permanecen como endófitos y ante la falta de nutrientes en especial nitrógeno y fosfatos causan síntomas de diversas micosis (Morales y Rodríguez, 2005), es por ello que existe la

necesidad de contar con un bioinoculante que permita mejorar la producción de mango sin afectar el medio ambiente y el suelo (Fondo de Tecnología Agraria - FTA, 2007).

Los principales géneros de hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de mango son: *Phytophthora*, *Fusarium*, *Phytium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Lasiodiplodia* entre otros. De estos géneros se destacan las especies *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia theobromae*, señalados como los principales agentes causales de antracnosis y muerte regresiva respectivamente (González *et al.*, 1999; Rodríguez, 2001; Maldonado y Álvarez, 2007).

Actualmente diversos estudios reportan a las rizobacterias de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus* como eficaces promotores de crecimiento vegetal y a la vez biocontroladores de hongos fitopatógenos, los cuales pueden ser aplicados también como bioinoculantes (Kumar *et al.*, 2001; Aquilanti *et al.*, 2004; Kizilkaya, 2008; Corkidi *et al.*, 2009). Es por ello que la presente investigación se buscó aislar y seleccionar rizobacterias del género *Azotobacter* y *Bacillus* con potencial aplicación como bioinoculante en el cultivo de *Mangifera indica* L (mango), para lograr la mejora de la producción nacional y con ello contribuir al desarrollo del país.

III. MARCO TEORICO

3.1 El mango (*Mangifera indica* L)

El mango es un cultivo originario del Noroeste de la India, de la Región Indo-Birmánica y las montañas Chittagong en Bangladesh. Se estima que esta planta fue domesticada por el hombre desde hace 6000 años (Mora *et al.*, 2002).

La clasificación taxonómica del mango (Parrotta, 1993; Minaya, 1999) se ubica de la siguiente manera:

Clase: Dicotiledóneas

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Suborden: Anacardiineae

Familia: Anacardiaceae

Género: *Mangifera*

Especie: *Mangifera indica* L

El mango es muy apreciado por sus frutos, con un delicioso sabor, alto valor nutritivo, y que se destacan por su alto contenido de vitaminas A y C, minerales y carbohidratos. Una porción de 140 g de mango contiene el 20% ó más del valor diario recomendado de consumo de vitamina C. Una libra de mango equivale a $\frac{3}{4}$ de taza de una mezcla de frutas. Además de sus atributos como alimento, los extractos de esta planta se han utilizado en la práctica etnomédica (Guevara *et al.*, 1998; Núñez *et al.*, 1998).

3.2 La planta de mango

El mango un árbol de hoja perenne y de amplia copa tupida que puede llegar hasta una altura de 25 a 30 metros. Tiene un sistema radical denso y vigoroso, en condiciones naturales posee una raíz principal pivotante de 6 a 8 m y un sistema de raíces adventicias superficiales cuya concentración se encuentra en su gran mayoría en los primeros 2,5 m de suelo (Minaya, 1999).

El tronco es más o menos recto, cilíndrico y de 75-100 cm de diámetro, con una corteza de color gris – café, tiene grietas longitudinales o surcos reticulados poco profundos que a veces contienen gotitas de resina. Su sabia es tóxica e irritante y puede causar lesiones en la piel (Galán, 2000).

Las hojas son lanceoladas, de unos 25 cm de largo, alternas y dispuestas en espiral, de color rojizo al inicio de su crecimiento y de color verde después. Esta planta presenta inflorescencias son ramificadas y terminales, de aspecto piramidal, de 6-40 cm de largo, de 3-25 cm de diámetro; las raquias son de color rosado o morado, algunas veces verde amarillentas. Las flores se producen en las cimas densas o en la últimas ramitas de la inflorescencia y son de color verde–amarillento, de 0,2-0,4 cm de largo y 0,5-0,7 cm de diámetro cuando están extendidas. La polinización del mango es esencialmente entomófila, siendo los principales polinizadores, insectos del orden Díptera, señalándose como uno de los principales polinizadores a la mosca casera y otros ordenes como himenópteros, lepidópteros, heterópteros (Mora *et al.*, 2002).

El fruto es una drupa grande y carnosa con fibra, que puede contener uno o más embriones. Generalmente la fruta tarda entre 100 a 120 días de floración a cosecha. La forma, tamaño, peso y color depende de la variedad. La forma es comúnmente ovalada y puede ser redonda o muy alargada, el tamaño varía de 5 a 25 cm de largo, y el peso desde 50 g hasta más de 2 kg. La cáscara es suave y cerosa, de color verdoso, amarillo o rojo y envuelve la parte comestible, que al madurar es amarilla (Galán, 1990).

El fruto consta de una sola semilla, de forma ovoide u oblonga que está rodeada por un endocarpio fibroso cuando está madura. La testa es fina y permeable; existen dos tipos de semilla, las monoembriónicas y las poliembriónicas (Minaya, 1999).

3.3 El cultivo de mango

El mango es una planta que se cultiva comercialmente en los trópicos (Galán 1990), desde el nivel del mar hasta los 1200 m de altitud pero desarrolla mejor en alturas inferiores a 600 m, puede ser sembrada en cualquier época del año y se adapta a regiones donde existe una estación seca y una estación húmeda bien definidas (Mora *et al.*, 2002).

Los requerimientos agroecológicos que tiene este cultivo son: clima tropical o subtropical seco, humedad relativa por debajo de 70%, precipitación entre 700 y 1500 mm, temperatura entre 20 y 25 °C, suelo de textura intermedia, sin exceso de sales y profundidad de 1,5-2,0 m (Durán *et al.*, 2003).

Para el cultivo de mango lo ideal es sembrar este frutal en suelos sueltos y bien drenados, para que se facilite la penetración radicular, de buena fertilidad natural, y con un pH entre 5,5 y 7,5. La textura del suelo debe ser franco arcillosa, franco arenosa o franco limosa. Se deben evitar los suelos arenosos, ligeros y las arcillas pesadas, puesto que en los primeros el drenaje es excesivo mientras que los segundos son casi impermeables (Minaya, 1999).

La temperatura tiene un rol muy importante en periodos previos y durante la floración, en el cuajado del fruto hasta su total crecimiento (Núñez y Davenport, 1995; Protacio *et al.*, 2006;). Cuando la temperatura desciende por debajo de los 10°C, el crecimiento del árbol es muy lento y su floración muy baja; a partir de los 5°C hacia 0°C, la floración y los frutos son muy dañados y las plantaciones en desarrollo son destruidas totalmente (Núñez y Davenport, 1991). El mango no prospera donde la temperatura media cae por debajo de los 15°C (Minaya, 1999).

La luminosidad no influye en la iniciación floral, pero si tiene gran efecto en el crecimiento, desarrollo y rendimiento del árbol, también parece tener incidencia en

el tamaño y coloración de la fruta siendo un hecho muy conocido que los frutos con mayor exposición a la luz solar desarrollan un mejor color y sabor (Chaikiattigos *et al.*, 1997).

La disponibilidad de agua y el manejo hídrico son muy importantes en este cultivo, se debe contar con agua suficiente en el período de desarrollo y maduración del fruto. La mayor necesidad de agua se tiene en los dos primeros años de vida: 15 a 20 litros semanales por árbol; sin embargo lluvias fuertes en el período de floración son muy dañinas, ya que provocan la pérdida de polen e impiden la polinización por los insectos. No debe faltar la humedad durante el crecimiento vegetativo y la formación de frutos. Sin embargo, se requiere de un período de sequía de 2-3 meses para provocar la inducción floral (Núñez y Davenport, 1994).

La humedad relativa es importante, si la humedad atmosférica es medianamente alta resulta favorable y dará buenos rendimientos; mientras que atmósferas secas acompañadas de altas temperaturas son muy dañinas, sobre todo para frutos jóvenes y hojas. El viento es muy dañino sobre todo en las etapas de floración y formación de frutos, donde puede causar la caída de estas estructuras reproductivas (Mora *et al.*, 2002).

El mango puede ser producido a partir de semillas o de porta injertos. El proceso del cultivo de mango tiene dos fases, la primera en el vivero y la segunda en campo. La fase de vivero se inicia con la selección de semillas de los mejores frutos de las variedades patrón; se prepara una cama de germinación donde las semillas son sembradas luego de haberles retirado el endocarpo (parte dura de la semilla) y sumergido en agua durante 4 horas para facilitar la germinación (Sergent, 1999), las semillas germinan a los 15 días, y son regadas durante un mes. Después las plántulas a las que se denomina porta injerto son retiradas de la cama de

germinación y se verifica el desarrollo correcto de la raíz antes de ser trasplantadas a bolsas de polietileno negras, donde crecerán durante un mes para ser injertadas con yemas de las variedades de exportación (Minaya, 1999).

La variedad de mango más usada como patrón es el “criollo”, en el departamento de Piura se usa el “criollo de Chulucanas”; sin embargo es poliembriónico por lo que de una semilla germinan varias plántulas de poco vigor. Estudios realizados sugieren que la variedad “Haden” es más conveniente porque al ser monoembriónico da una sola planta con mayor vigor, de diámetro más compatible y de mayor afinidad con las yemas injerto de las variedades de exportación (Cumare y Avilán, 1994). Las variedades de mango cultivadas en el Perú son de dos tipos: las plantas francas (no injertadas y poliembriónicas) y las variedades mejoradas (injertadas y monoembriónicas). Las plantas francas son: el “criollo de Chulucanas”, el “Chato de Ica”, el “Rosado de Ica”, etc. Los frutos son de color amarillo, pulpa fibrosa y de agradable sabor. Las variedades mejoradas son “Haden”, “Kent”, “Tommy Atkins” y “Edward” (Minaya, 1999).

La fase de campo se realiza cuando el porta injerto ya se ha aclimatado, muestra vigor y se ha desarrollado el brote del injerto. Para esta fase el suelo debe ser preparado, estar limpio de malezas, húmedo, y con hoyos entre 3 a 6 m de distancia y de profundidad suficiente para que la raíz de la planta porta injerto traída del vivero quede totalmente extendida y se evite enroscamiento que puede generar atrofia y evitar el desarrollo de la planta (Wills y Marler, 1993). Deberán realizarse podas de formación y de fitosanidad, después de un periodo de 2 a 4 años se realizara la cosecha de frutos, así como un plan de fertilización adecuado (Sergent *et al.*, 1995; Protacio, 2000).

3.4 Importancia económica del mango

El mango es el tercer fruto tropical en términos de producción e importación a nivel mundial. Se produce en alrededor de 90 países en el mundo. Asia representa aproximadamente el 77% de la producción global de mango y América el 13% (FAOSTAT 2002).

Con respecto a la comercialización, México, Brasil, Perú, Ecuador y Haití son los mayores proveedores del mercado norteamericano. India y Pakistán son los abastecedores predominantes en el Oeste Asiático. Las Filipinas y Tailandia abastecen mayormente el mercado del sur del Asia. La Unión Europea se abastece de mangos de Sudamérica y Asia.

Perú es un importante productor de mangos de Sudamérica y su principal mercado es Estados Unidos y Europa. Los principales departamentos que producen mango son: Piura, Chiclayo, Cajamarca, Lima, Trujillo e Ica. El 30% de la producción se destina a la exportación en estado fresco, el 50% al consumo interno y el 20% a la agroindustria (Rivera, 2009). Actualmente la demanda de mango fresco, pulpa congelada y mango orgánico para exportación se está incrementando debido a los últimos tratados y acuerdos de comercio y a la necesidad cada vez mayor de consumir alimentos frescos y libres de químicos, por sus efectos nocivos en la salud humana (Pavez y Alas, 2004).

Según la Asociación Peruana de Productores y Exportadores de Mango (APEM), El mango peruano se produce principalmente en la costa norte del Perú, en los departamentos de Piura, Lambayeque y La Libertad.

3.5 Mango Orgánico

El mango orgánico es el resultado de un sistema de cultivo sin el uso de agroquímicos, manejando la nutrición sobre la base de abonos orgánicos y el control de plagas mediante prácticas culturales, mecánicas y biológicas (Minaya,

1999). En promedio, si bien tiene rendimientos menores frente a una explotación convencional intensiva como las que pueden gestionar medianos y grandes agricultores, el mango orgánico tiene un plus en el precio de hasta 30% por encima del convencional, sumándose a ello que generalmente es producido por asociaciones de productores vinculados a otros nichos de mercado como el Comercio Justo que les generan ingresos adicionales. Para poder venderse como orgánica la fruta debe haber sido certificada bajo esta modalidad por una empresa certificadora acreditada ante el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) y la autoridad competente que corresponda en el mercado de destino (Cruzado, 2009).

Para nuestro país el mercado principal de mango orgánico fresco es Inglaterra, seguido por Holanda; sin embargo para la pulpa de mango orgánico el principal mercado es Holanda seguido de Alemania. Actualmente la demanda de este producto es mayor en Europa, es por ello que los productores agrarios de diversos valles de Piura se están organizando en asociaciones que buscan el asesoramiento para la implementación de sistemas que les permitan producir mango orgánico, tal es el caso de la Asociación de Productores de Mango de Exportación del Sector Hualtaco, la Asociación de Pequeños Productores de Mango de San Isidro y la Asociación de Productores Agrarios de Pedregal, quienes vienen participando de diversos proyectos con ayuda del gobierno central y empresas privadas (FTA, 2007; Cruzado, 2009). No obstante uno de los factores que afecta la producción son las enfermedades que atacan al cultivo de mango, debido a que el tratamiento no debe hacerse con productos químicos, es por ello que existe la necesidad de contar con biocontroladores de fitopatógenos para el cultivo de mango orgánico ya que de este modo se podría incrementar la producción nacional lo que nos permitiría ingresar a mas mercados internacionales.

3.6 Principales enfermedades del cultivo de Mango

Las enfermedades que afectan al cultivo de mango son causadas por insectos y hongos. Las micosis son las de mayor importancia debido a que se vienen incrementando por los cambios climáticos, que generan las condiciones favorables para la aparición de estas enfermedades. Los hongos que afectan el cultivo de mango que se han reportado son *Phytophthora*, *Fusarium*, *Phytium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Lasiodiplodia*, entre otros (Mora *et al.*, 2003; Morales y Rodríguez, 2006). Estos hongos causan micosis que son denominadas de diferentes formas y pueden afectar la pre cosecha, la post cosecha o ambas etapas.

En nuestro país la “antracnosis” causada por *Colletotrichum gloeosporoides*, es la principal enfermedad pre y post cosecha del mango, causando pérdidas directas de rendimiento en el campo, en las plantas de empaque, así como en la calidad del fruto y su comercialización posterior; sin embargo en los últimos años el incremento de la micosis denominada “muerte regresiva” causada por *Lasiodiplodia theobromae* ha sido evidente (Maldonado y Álvarez, 2007).

3.7 Rizósfera

La relación suelo - planta se caracteriza por una interrelación cíclica dada por lo que el suelo le aporta a las plantas y la necesidad de estas para que el suelo mantenga su fertilidad natural (Atlas y Bartha, 2000)

El suelo es un hábitat bastante complejo, por la riqueza de componentes y la gran diversidad de microorganismos que posee, entre los que se encuentran bacterias, hongos, actinomicetos, protozoos y algas (Gryndler, 2000; Cavaletti *et al.*, 2006).

La rizósfera es el volumen de suelo que está en contacto con las raíces de la planta, donde se desarrollan interacciones complejas. Las raíces inducen la proliferación de microorganismos y éstos a su vez con sus actividades metabólicas

desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, en la rizósfera son de vital importancia para el desarrollo de las plantas (Barea *et al.*, 2005).

La rizósfera es relativamente rica en nutrientes pues el 40 % de las sustancias producidas en la raíz se pierden en el suelo en forma de exudados solubles (Rico, 2009). Las comunidades bacterianas de la rizósfera tienen un eficiente sistema de absorción y catabolismo de compuestos orgánicos de los exudados; también tienen la habilidad de adherirse a la superficie de las raíces o penetrar en el tejido radical (Tilak *et al.*, 2005).

Las raíces de las plantas secretan un complejo polisacarídico mucilaginoso, que constituye fuente de carbono para el desarrollo de los microorganismos, ejerciendo un efecto selectivo sobre los microorganismos en la rizósfera (Hernández, 2002).

3.8 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)

Las bacterias que habitan la rizósfera reciben el nombre de rizobacterias; pueden localizarse dentro de estructuras especializadas como los nódulos de las leguminosas, estableciendo simbiosis mutualista estricta, o pueden estar sobre la raíz formando una simbiosis asociativa (Loredo *et al.*, 2004; Peña y Reyes, 2007).

Las rizobacterias estimulan significativamente el crecimiento de las plantas e incrementan sus defensas frente a otros microorganismos causantes de enfermedades, por lo que son denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPR por sus iniciales en inglés (plant growth promoting rhizobacteria) (Puente *et al.*, 2009).

Para que una rizobacteria sea considerada como PGPR debe cumplir tres requisitos básicos: tener un alto tiempo de permanencia en la rizósfera, posibilidad de colonizar las raíces para ejercer un efecto fisiológico directo sobre el crecimiento

de las plantas, y no provocar daño al suelo, planta animal o al hombre (Bach y Díaz, 2008).

Los mecanismos por los cuales las PGPR promueven el crecimiento vegetal son varios dentro de los cuales se destacan: fijación de nitrógeno, producción de sustancias reguladoras del crecimiento como fitohormonas (ácido indol acético, ácido giberélico, etileno y citoquinas), producción de sustancias que movilizan nutrientes tales como sideróforos y fosfatasas, y además de tener la capacidad de antagonismo frente a fitopatógenos (De Freitas *et al.*, 1997; Arshad y Frankenberger, 1998; Nogales, 2005).

En cuanto al efecto positivo las PGPR pueden actuar de forma indirecta o directa. De forma indirecta los metabolitos producidos pueden funcionar como determinantes antagónicos, e involucran aspectos de control biológico, suprimen o inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta, vía producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas o inducción de mecanismos de resistencia. La forma directa ocurre cuando los metabolitos producidos son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de estos por parte de la planta. El efecto positivo se puede evidenciar al observar un incremento en la emergencia, vigor y el peso, un mayor desarrollo de sistemas radicales y un incremento hasta el 30 % en la producción de cultivos de interés comercial (Glick, 1995; Loredó *et al.*, 2004).

Dentro del grupo de PGPR, se encuentran los géneros: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* (Dobbelaere *et al.*, 2003; Torriente, 2010).

3.9 Capacidades Promotoras del Crecimiento Vegetal

3.9.1 Antagonismo y control biológico de fitopatógenos

El efecto negativo de los microorganismos patógenos del suelo es muy conocido en agricultura, debido a que son la causa de cuantiosas pérdidas económicas. Para llevar a cabo el manejo y control de fitopatógenos se ha utilizado durante muchos años insumos químicos; pero debido a los efectos negativos tales como, aparición de microorganismos con resistencia, deterioro de los suelos y contaminación química de los alimentos lo que causa efectos nocivos en la salud humana, cada vez es más urgente y necesario encontrar nuevas tecnologías para el control y manejo de microorganismos fitopatógenos. El uso de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) para el control de fitopatógenos es una de las tecnologías limpias y amigables con el medio ambiente y la salud humana, que actualmente se está implementando en diferentes lugares del mundo y para diversos tipos de cultivo (Daban, 2004).

Estudios previos revelan que el control biológico realizado por las PGPR involucra la producción de metabolitos bacterianos los cuales reducen la población y la actividad de fitopatógenos. Estos metabolitos incluyen a los sideróforos y a los antibióticos; los sideróforos se unen al Hierro (Fe) haciéndolo menos disponible para ciertos patógenos del suelo, los antibióticos causan antagonismo logrando reducir o inhibir la población de fitopatógenos (Crowley *et al.*, 1991).

Otro mecanismo por el cual las PGPR logran el antagonismo de fitopatógenos es la competencia, que se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduce la disponibilidad para los demás. Existen tres tipos de competencia: por nutrientes, por oxígeno y por espacio. La competencia por carbono es la más importante con respecto al control de hongos, debido a que

ocasiona fungistasis, es decir la inhibición de la germinación de esporas del hongo en el suelo (Rico, 2009).

Diversos estudios señalan a los géneros *Azotobacter* y *Bacillus* como los más importantes en el control biológico de enfermedades de plantas (Hernández *et al.*, 2006; Villa *et al.*, 2007).

3.9.2 Solubilización de Fosfatos

El fósforo, es el segundo nutriente inorgánico más requerido por las plantas. En el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal, pues las concentraciones de fósforo asimilable son muy bajas, los valores están entre 5 y 30 mg/kg. Esto se debe a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, fierro o aluminio, que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para las plantas. El uso de fosfatos inorgánicos en los fertilizantes químicos no soluciona la deficiencia porque estos también son inmovilizados en el suelo y no son aprovechados (Atlas y Bartha, 2002). Una alternativa ante este problema es el uso de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR), debido a que estos microorganismos tienen la capacidad de transformar las formas insolubles del fósforo en formas solubles, a través de reacciones enzimáticas, haciendo que el fósforo sea disponible para las plantas (Oviedo e Iglesias, 2005).

Dentro del grupo de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) con significativa capacidad solubilizadora de fosfatos están los géneros: *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Rhizobium* (Vásquez *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2001; Peña y Reyes, 2007).

3.9.3 Producción de Acido Indol Acético

Las fitohormonas tienen un rol importante como reguladores del crecimiento y desarrollo de las plantas. Las fitohormonas contribuyen al funcionamiento de

diversos procesos biológicos de las plantas, incluyendo la regulación de la quiescencia y germinación de las semillas, formación de las raíces, florecencia y maduración del fruto. A su vez, incrementan la resistencia de las plantas a factores ambientales y pueden inducir o suprimir la expresión de genes y la síntesis de enzimas, pigmentos y metabolitos (Celis y Ricardo, 2008; Tsavkelova *et al.*, 2006). Existen cinco grupos de fitohormonas: auxinas, giberelinas, citoquinas, etileno y ácido absísico. Del grupo las auxinas la mas estudiada es el acido Indol acético en cuanto a su producción por Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, y es característico de los géneros: *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Streptomyces* (Manulis *et al.*, 1994; Tsavkelova *et al.*, 2006).

3.9.4 Fijación de Nitrógeno

El nitrógeno es el elemento más limitante para el crecimiento de las plantas en suelos tropicales (Franco y Dobereiner, 1994), la fijación de nitrógeno atmosférico (N_2) es un proceso indispensable para el desarrollo de la planta; dicho elemento es primordial en la formación de estructuras moleculares como los ácidos nucleicos, aminoazúcares, aminoácidos, entre otros (Franco, 2008). Es por ello que se ha incrementado el uso de productos de síntesis, con el ánimo de aumentar la producción agrícola; sin embargo esto ha causado efectos negativos en los recursos naturales, tales como acumulación de nitratos en las aguas freáticas, toxicidad en las plantas por la presencia de altos niveles de NO_2 en los suelos, contribuyendo con la muerte de la biota del suelo, ocasionando desequilibrios en los procesos naturales biogeoquímicos que se traducen en un alto costo económico, social y ecológico (Marín *et al.*, 2003).

A nivel microbiano, el complejo nitrogenasa ha sido ampliamente estudiado en la fijación de nitrógeno, pues se presenta en varias rizobacterias miembros PGPR. La fijación biológica de nitrógeno con microorganismos del suelo es considerada uno de los principales mecanismos por el cual las plantas encuentran beneficio de la

asociación, uno de los beneficios más estudiados es la relación mantenida con microorganismos diazotróficos, que proveen a la planta de nitrógeno y ésta les proporciona fuentes de carbono disponible en los exudados (Zahir *et al.*, 2004).

La capacidad para fijar nitrógeno según diversos estudios, es característico de los géneros: *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Azotomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Chromatium*, *Chlorobium*, *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella* (Torres *et al.*, 2000; Jiménez, 2007).

3.10 Características del género *Bacillus*

El género *Bacillus* tiene la propiedad de adaptarse a cambios bruscos de temperatura, porque cuentan con genes de shock térmico inducibles que incluyen proteínas chaperonas y proteasas (Petersohn *et al.*, 2001), además poseen otros mecanismos para asegurar su sobrevivencia ante condiciones físicas desfavorables, pero si estas respuestas fallan para poder mantenerse en estado vegetativo se induce la esporulación (Petersohn *et al.*, 2001). La habilidad de formar endosporas altamente resistentes, es una característica muy importante para ser PGPR, porque de este modo permanecen por más tiempo en la rizósfera de las plantas (Bach y Díaz, 2008).

Las bacterias del género *Bacillus*, se caracterizan por ser Gram positivas, tener forma bacilar, movilidad flagelar, presentan flagelos insertados en forma peritrica, pueden llegar a medir de 0,5-2,5 a 1,2-10 μm , son aerobias estrictas o facultativas, quimiorganótrofas (Holt *et al.*, 2000). Pueden crecer en un amplio rango de temperatura, soportan altas salinidades y distintos pH, pero el pH mínimo en que crecen es de 2 a 3. (Chamorro, 2006; Márquez, 2007).

Las colonias de *Bacillus* tienen forma irregular y color crema, la apariencia de los bordes de las colonias varía entre aserrada, lobulada, digitiforme y ondulada; las

elevaciones de la colonias suelen ser planas o acuminadas, en este último caso presentan el centro más elevado en forma de anillo, la consistencia suele ser seca pero también se presentan colonias cremosas y ligosas, la gran mayoría presenta una superficie opaca y la consistencia y tamaño es variable (Calvo y Zúñiga, 2010). Bioquímicamente este género es catalasa positivo, nitrato positivo, citrato negativo, almidón positivo, reducen azúcares tales como glucosa, manitol, xilosa y arabinosa (Holt *et al.*, 2000). La prueba bioquímica de producción lecitinasa es muy importante según la Agencia de Protección de la Salud (HPA por sus iniciales en inglés Health Protection Agency) (2004) debido a que las 4 principales especies de este género que son lecitinasa positiva son *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*. A excepción de *B. thuringiensis*, todas son patógenas para el ser humano por lo cual no se debe usar como PGPR, ya que uno de los tres requisitos básicos para ser PGPR es no ser patógena.

Dentro de las propiedades por las que se considera a este género como PGPR esta su capacidad de solubilización de fosfato (Chatli *et al.*, 2008); síntesis de fitohormonas como el ácido indol acético (Vessey, 2003); síntesis de antibióticos y metabolitos termoestables; enzimas extracelulares como proteasas y quitinasas; sustancias con actividad biocida, tales como subtilisina, iturinas y polimixinas; pueden formar un cristal de proteína, conocido como delta-endotoxina, que se forman durante la esporulación y tienen actividad tóxica para larvas de insectos (Sánchez, 2004). Por todas estas propiedades es considerado como uno de los géneros más importantes para el uso de control biológico (Todar, 2003; Rahman *et al.*, 2006; Mojica *et al.*, 2009).

3.11 Características del género *Azotobacter*

Las bacterias del género *Azotobacter*, se caracterizan por tener una morfología celular variable ya que cambia según las condiciones ambientales existentes, por lo que se dice que es pleomórfica (Rico, 2009). Una de las formas que adopta ante condiciones desfavorables, es la formación de quistes, que le confieren resistencia, esta es una característica muy importante para ser PGPR, porque de este modo permanecen por más tiempo en la rizósfera de las plantas (Bach y Díaz, 2008).

La forma celular depende de la edad del cultivo; así en cultivos jóvenes se les observa en forma bacilar, mientras que en cultivos viejos tienden a ser elipsoidales y en ciertos casos es común observar gránulos sudanofílicos y metacromáticos y son Gram negativas (Kennedy, 1901; Tejera *et al.*, 2005).

Las colonias jóvenes de estos microorganismos son generalmente lisas o arrugadas, opacas, convexas, viscosas y el color depende del medio de cultivo, pueden llegar a medir entre 2 y 6 mm de diámetro en 5 días a una temperatura de 28 a 30 °C (Rico, 2009; Jiménez, 2007).

Son microorganismos aerobios pero algunos pueden vivir en tensiones bajas de oxígeno y su movilidad se debe a flagelos peritricos; además, producen pigmentos solubles en agua en medios específicos (Holt, 2000). La fijación de nitrógeno depende de la presencia de Mo, Va, o enzimas nitrogenasas que contengan Fe. Son quimioorganotróficas puesto que utilizan para su crecimiento azúcares, alcoholes y sales inorgánicas. Crecen en un pH mínimo de 4,8-6,0 y a un máximo de 8,5, con un pH ideal de 7,0-7,5 (Rico, 2009; Jiménez, 2007).

Bioquímicamente son catalasa y oxidasa positivo, reducen el nitrato, utilizan como fuente de carbono y energía a la fructosa, glucosa, sucrosa, acetato, fumarato, piruvato, succinato, acetilmetilcarbinol y α -oxoglutarato, producen el sulfuro de hidrógeno e hidrolizan almidón (Holt, 2000; Jiménez, 2007).

Dentro de las propiedades por las que se considera a este género como PGPR se tiene que producen metabolitos promotores de crecimiento (giberelinas, auxinas y citoquininas), fijan asimbióticamente nitrógeno, son solubizadoras de fosfato, antagonista de fitopatógenos y realizan procesos de biodegradación de plaguicidas como el endosulfan (Santana *et al.*, 2002).

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Aislar y seleccionar rizobacterias del género *Azotobacter* y *Bacillus* con potencial aplicación como bioinoculante en el cultivo de *Mangifera indica* L (mango).

4.2 Objetivos Específicos

- Aislar bacterias del género *Azotobacter* y *Bacillus* de la rizósfera de plantaciones de *Mangifera indica* (mango).
- Evaluar la capacidad antagonista de las cepas aisladas por su actividad frente a los principales hongos fitopatógenos del mango (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora sp*, *Fusarium sp*, y *Alternaria sp.*)
- Evaluar mediante prueba in vitro la capacidad de solubilización de fosfatos, producción de ácido indol acético, y fijación de nitrógeno de las cepas aisladas.
- Seleccionar las cepas del género *Azotobacter* y *Bacillus* con mejores resultados obtenidos en las pruebas anteriores y que no son antagonistas entre sí, para mezclas de cultivos a utilizarse como bioinoculantes.
- Evaluar los bioinoculantes diseñados en la prueba anterior por su efecto benéfico nivel de almácigo del mango, considerando el tiempo de germinación, número de hojas, altura del tallo y presencia-ausencia de síntomas de micosis.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL

Material biológico:

- ✓ Muestras de tierra de la rizósfera de plantaciones de *Mangifera indica* L (mango). Los muestreos se realizaron en el departamento de Piura en el valle de San Lorenzo en el caserío de Pedregal.
- ✓ Cepas de referencia genero *Bacillus* sp de la colección del laboratorio de Ecología Microbiana UNMSM y *Azotobacter vinelandi*, donada por el United States Department of Agriculture – USDA
- ✓ Hongos fitopatógenos: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora* sp, *Fusarium* sp, y *Alternaria* sp, proporcionadas por Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) – Lima - Perú.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Toma de muestras de rizósfera

Las muestras consistieron en porciones de suelo tomadas de la zona rizosférica de plantaciones de cultivo de mango (Figura 1). Se muestrearon un total de 5 campos de cultivo de mango, de los cuales se tomaron dos muestras al azar de cada uno. La muestra incluyó porciones de suelo colectadas asépticamente de la zona en contacto con la raíz, con un peso promedio de 0,5 kg, las cuales una vez recolectadas en bolsas ciplox y debidamente rotuladas (Figura 2), fueron trasladadas al laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima – Perú, para ser procesadas.

5.2.2 Tratamiento de las muestras

Una vez en el laboratorio las muestras fueron pesadas y codificadas, procediendo luego a medir el pH de cada una. Las muestras se procesaron según metodologías recomendadas para aislar e identificar cepas de los géneros *Bacillus* y *Azotobacter*.

5.2.3 Aislamiento e identificación del género *Bacillus*

Se realizó siguiendo la metodología de Márquez, (2007); para lo cual se tomó 1 g de tierra que formó parte de la rizósfera y se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-5} , seguido de shock térmico y siembra inmediata de las 2 últimas diluciones en Agar Nutricio (AN), los cultivos fueron incubados a 28-30°C durante 24- 48 h. Luego se realizaron replicas sucesivas de las colonias que presentaban la morfología típica característica de *Bacillus* y se realizaron pruebas bioquímicas como catalasa, utilización de citrato, reducción del nitrato, hidrólisis de almidón, producción de lecitinasa y utilización de azúcares siguiendo las metodologías señaladas por Márquez (2007) y Calvo (2010). Finalmente las cepas se distribuyeron en viales usando Agar Nutricio (AN) más glicerol al 15 % (v/v).

5.2.4 Aislamiento e identificación del género *Azotobacter*

Se realizó según la metodología descrita por Jiménez (2007) y Rico (2009). Se tomó 1 g de tierra de la rizósfera de cada muestra, se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-5} en solución salina al 0,85%, se tomó 1mL de las 2 últimas diluciones para luego inocular en tubos con Caldo Mineral sin Nitrógeno (CMSN). La incubación se realizó a 28°C por 5 a 7 días, y luego de este tiempo, de cada cultivo positivo se sembró por duplicado en el medio Agar Ashby Glucosa (AAG) para su aislamiento, con incubación a 28°C por 7 días al cabo de este tiempo se realizaron réplicas sucesivas de aquellas colonias que presentaban la morfología típica de *Azotobacter*. Luego de la obtención de colonias puras, cada aislamiento de *Azotobacter* fue sometido a la tinción Gram con el objetivo de reconocer las

características microscópicas típicas del género. Posteriormente, se realizaron las pruebas bioquímicas como determinación de catalasa y oxidasa, reducción de nitrato, utilización de azúcares, formación de quistes. Finalmente las cepas se distribuyeron en viales usando Agar Tripticosa de Soya (TSA) más glicerol al 15 % (v/v).

5.2.5 Comportamiento cultural de las cepas de *Bacillus* y *Azotobacter* aisladas.

5.2.5.1 Crecimiento a diferentes temperaturas

En placas de Agar Tripticosa de Soya (TSA) y Agar Nutritivo (AN) se sembraron 15 μ L (10^6 ufc/ml) de un cultivo de 24 h de *Azotobacter* y *Bacillus* respectivamente y, luego se incubaron a las temperaturas de 18, 25 y 32 °C, usando un control a 28 °C. La evaluación se realizó midiendo el diámetro de las colonias cada 48 h durante 15 días comprobando así el crecimiento y la adaptabilidad de cada aislamiento a las diferentes temperaturas a las que se enfrenta el cultivo de mango en el departamento de Piura (Minaya, 1999).

5.2.5.2 Crecimiento a diferente pH

En placas de Agar Tripticosa de Soya (TSA) y Agar Nutritivo (AN) se sembraron 15 μ L (10^6 ufc/ml) de un cultivo de 24 h de *Azotobacter* y *Bacillus* respectivamente. Ambos medios fueron regulados a pH 5,5, 7 (control) y 7,5. La evaluación se realizó midiendo el diámetro de las colonias cada 48 h durante 8 días, con el objetivo de determinar la capacidad adaptativa de las cepas al pH de los suelos de cultivo de mango (Minaya, 1999).

5.2.6 Pruebas para capacidades promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) *in Vitro*

Cada cepa de las bacterias del género *Azotobacter* y *Bacillus* fue sometida a algunas pruebas de capacidad PGPR *in Vitro*.

5.2.6.1 Prueba de antagonismo

Para determinar la capacidad de antagonismo se utilizó la técnica reportada por Gutiérrez (2003) y Rico (2009) para los géneros *Bacillus* y *Azotobacter* respectivamente. Se reactivaron las cepas en Caldo Tripticasa de Soya (TSB) por sus iniciales en inglés (Trypticase Soy Broth) a 28°C y con una agitación de 150 rpm hasta durante 48 h, obteniendo turbidez equivalente al tubo 1 de la escala patrón de Mc Farland. Se sembraron por triplicado usando la técnica de estriado de las cepas de las bacterias en puntos equidistantes en placas de Agar Papa Dextrosa (APD), se incubaron a 28°C durante 48 h. Luego con ayuda de un sacabocado se retiró de una placa de cultivo del hongo fitopatógeno una porción y se colocó invertido en el centro de la placa con las cepas bacterianas alrededor. Se usaron placas control del hongo sin bacterias, las cuales nos indicaron el tiempo de la lectura final de la prueba. El tiempo de lectura final de la prueba fue de 4 días para *Lasiodiplodia theobromae*, 6 días para *Colletotrichum gloeosporioides*, 7 días para *Phytophthora sp* y *Fusarium sp*, y 9 días para *Alternaria sp*. (Tabla 12). La determinación de la inhibición del crecimiento fúngico se hizo usando el método reportado por Ezziyyani *et al.* (2004), mediante el cálculo del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR), $PICR = (R1 - R2)/R1 \times 100$, donde R1 y R2 son los radios mayor que corresponde al lado donde no existe influencia del antagonista y menor que corresponde al lado donde existe influencia del antagonista respectivamente.

5.2.6.2 Solubilización de fosfatos

Se realizó una evaluación cualitativa de solubilización de fosfatos siguiendo la metodología descrita por Vásquez *et al.* (2000). Para tal fin se reactivaron las cepas de *Bacillus* y *Azotobacter* en caldo tripticasa de soya (TSB) y a partir de cultivos con concentraciones equivalentes al tubo 1 de la escala patrón de Mc Farland se sembró 10 µL en puntos equidistantes en placas con Agar Picovskaya, se incubaron a 30°C por un período de 24 - 72 horas. Se tomó como efecto solubilizador la presencia de un halo de aclaramiento mayor a 5 mm alrededor de cada colonia.

5.2.6.3 Prueba de la producción de Ácido Indol Acético (AIA)

Para determinar la producción de Ácido Indol Acético (AIA) de cada cepa aislada tanto de *Azotobacter* como *Bacillus* se realizó una evaluación cualitativa por medio de un método colorimétrico basado en la reacción del reactivo de Salkowsky al detectar compuestos derivados de indol (Rico, 2009). Se reactivaron las cepas de *Azotobacter* y *Bacillus* en TSB suplementado con L- triptófano durante 6 días a 28°C. Luego se colocó en cada pocillo de una placa de ELISA por duplicado 100 µL de cultivo de bacteria y 200 µL del reactivo de Salkowsky, así como también un control con caldo sin bacteria ni reactivo. Se colocó la placa de ELISA a oscuridad por 15 minutos para que el reactivo reaccione. Finalmente se realizó la lectura tomando el viraje de color de cada pocillo de amarillo hasta diversas tonalidades de fucsia como positivo para la presencia de ácido indol acético (AIA).

5.2.6.4 Prueba de Capacidad Potencial de Fijación de Nitrógeno

Para determinar la capacidad potencial de fijación de nitrógeno se reactivaron las cepas de *Bacillus* y *Azotobacter* y a partir de cultivos con concentraciones equivalentes al tubo 1 de la escala patrón de Mc Farland se sembraron en placas petri con medio selectivo para NFB (bacterias fijadoras de nitrógeno) y se evaluó el

crecimiento de la colonia midiendo el diámetro durante 15 días. Según Renie en 1988 (Cuervo 2010), este medio tiene una fuente combinada de carbono donde sólo crecen los microorganismos que poseen el complejo enzimático de la nitrogenasa que les permite reducir el nitrógeno atmosférico y utilizarlo en su metabolismo y por lo tanto son fijadores de nitrógeno.

5.2.7 Selección de cepas con mejores resultados para el diseño de los tipos de bioinoculantes

Se realizó el análisis acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo frente a hongos fitopatógenos, solubilización de fosfatos, producción de ácido indol acético y capacidad potencial de fijación de nitrógeno. Se seleccionaron las cepas que presentaron los mejores resultados, las cuales fueron sembradas en placas petri con Agar Trypticase de Soya en puntos equidistantes e incubarlas a 28 - 30 °C durante 15 días, para evaluar la posible capacidad de antagonismo que podrían mostrar entre sí las bacterias seleccionadas. Esta prueba permitió la combinación de cultivos para formular diferentes tipos de bioinoculantes.

5.2.8 Evaluación de los diferentes tipos de bioinoculantes a nivel de almácigo

Esta prueba se realizó a nivel de campo, es decir en el lugar del muestreo de la rizósfera del mango. Para ello primero se prepararon en el laboratorio los bioinoculantes, para lo cual se preparo cultivo de las cepas seleccionadas usando Caldo Trypticase de Soya (TSB), a pH 7, el volumen de fermentación fue en matraces de 1 L en condiciones de agitación constante a 180 rpm por 24 horas en un sheiker luego en condiciones de esterilidad se combinaron. Estos bioinoculantes se envasaron asépticamente en recipientes de vidrio color ámbar, herméticamente sellados y se mantuvieron en condiciones de refrigeración hasta el momento de su aplicación (Galindo *et al.*, 2006).

Se seleccionó semilla de mango de la zona y se tomó suelo de los campos muestreados; la mitad de suelo se esterilizó por el método de solarización (Figura 14) según Lozano *et al.*, (2008), para lo cual se dispuso el suelo en capas de 10 a 15 cm de espesor, se cubrió con plástico y se expuso a radiación solar durante 20 días y la otra mitad de suelo no fue esterilizado. El suelo y las semillas fueron trasladados al vivero “El Huerto” para preparar los almácigos. Para cada tipo de bioinoculante se trabajó por triplicado y se procedió de la siguiente manera: semilla inoculada con 10 mL del bioinoculante a probar y sembrada en suelo esterilizado, para ver los efectos positivos del bioinoculante sin la interferencia de posibles contaminantes del suelo y su control semilla sin inocular sembrada en suelo esterilizado; semilla inoculada con 10 mL del bioinoculante a probar y sembrada en suelo sin esterilizar, para ver el efecto del bioinoculante con la interferencia de posibles contaminantes y su control semilla sin inocular sembrada en suelo sin esterilizar. Se retiró en condiciones de esterilidad el endocarpo de la semilla y se sumergió en agua durante 4 horas para facilitar la germinación (Sergent 1999), después de este tiempo se procedió a sembrar las semillas, las que debían ser inoculadas se les agregó 10 mL del bioinoculante a probar. La inoculación se repitió a los 10 días de la siembra. Los almácigos se mantuvieron a una temperatura de 18 - 25 °C y se regaron con agua desinfectada con cloro (potable) 1 o dos veces al día, cada 3 días durante 2 meses. Los parámetros a evaluar fueron: tiempo de germinación, altura del tallo, número de hojas, presencia o ausencia de síntomas de micosis.

5.2.9 Diseño y análisis estadístico

Para comparar los rangos de actividad de las diversas cepas en las pruebas a realizarse se utilizó paquete estadístico SPSS, el programa Microsoft Excel para elaborar las Tablas, Figuras.

VI. RESULTADOS

6.1 Características generales del lugar de muestreo.

Las muestras de suelo rizosférico fueron calificadas como franco arcilloso, y franco limoso, con una temperatura de 28 - 30 °C y pH de 6 - 7,2, características adicionales se puede observar en la Tabla 1.

6.2 Aislamiento e identificación del género *Bacillus*

Se aislaron en total 23 cepas del género *Bacillus*, esto se logró tras realizarse replicas sucesivas de aquellas colonias que presentaban la morfología típica, en el medio Agar Nutricio, es decir colonias, color blanco o crema y de forma irregular y borde digitiforme o aserrado; tal como se aprecia en la Figura 3.

En la Tabla 2 se indica las cepas del género *Bacillus* obtenidas de cada campo de cultivo. Se puede apreciar que el campo de cultivo con mayor número de aislamientos es el campo C con 6 cepas de *Bacillus* confirmadas.

Asimismo la Tabla 3 muestra la caracterización morfológica de cada cepa de *Bacillus* aislada. En las Figuras 4 y 5 se muestran algunas pruebas bioquímicas realizadas y los resultados se aprecian en la Tabla 4.

6.3 Aislamiento e identificación del género *Azotobacter*

Se aislaron 29 cepas del género *Azotobacter*, esto se logró tras realizar réplicas sucesivas de las colonias que presentaban la morfología típica del género; es decir, colonias lisas de borde regular, brillosas u opacas y mucoides que crecieron en el Agar Ashby Glucosa hasta obtener colonias puras y caracterizarlas bioquímicamente (Figura 6 y 7).

En la Tabla 5 se puede apreciar que el campo de cultivo con mayor número de aislamientos para *Azotobacter* es el campo D con 9 cepas de *Azotobacter* confirmadas.

La Tabla 6 muestra la caracterización morfológica de las cepas de *Azotobacter*. Asimismo, la Tabla 7 señala los resultados de las pruebas bioquímicas respectivas.

6.4 Comportamiento cultural de las cepas de *Bacillus* y *Azotobacter* aisladas.

6.4.1 Crecimiento a diferentes temperaturas

La evaluación de la capacidad de crecimiento de *Bacillus* y *Azotobacter* a las temperaturas de 18, 25, 32 °C, durante 15 días se observa en la Tabla 8 y 9 respectivamente. En esta prueba se usó un control a 28°C y se encontró que ambos géneros crecieron más del 50 % con respecto al control a 28 °C lo que nos indicaría una gran adaptabilidad a las temperaturas a las que se enfrenta el cultivo de mango.

6.4.2 Crecimiento a diferente pH

En esta prueba cuya evaluación consistió en determinar la capacidad de las cepas de *Bacillus* y *Azotobacter* para crecer a los diferentes valores de pH que presentan los suelos de cultivo de mango, se usó un control a pH 7 y la evaluación se hizo durante 8 días. En la Tabla 10 y 11 se aprecian los resultados para los géneros *Bacillus* y *Azotobacter* respectivamente. Las cepas aisladas para ambos géneros presentan un crecimiento mayor al 50% con respecto al control pH 7, lo que nos indicaría una gran adaptación al rango de pH de 5,5 - 7,5 que se presenta en los suelos de cultivo de mango.

6.5. Pruebas para capacidades promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) *in Vitro*

6.5.1 Prueba de antagonismo

Esta fue la primera prueba para evaluar la capacidad promotora de crecimiento vegetal que se realizó a las cepas de los géneros *Bacillus* y *Azotobacter*. Al cabo de los respectivos tiempos de incubación solo algunas cepas de *Bacillus* y *Azotobacter*

presentaron antagonismo antifúngico (Tablas 13 y 15). Las Figuras 8 y 9 muestran algunas de las cepas frente a los hongos fitopatógenos. Ambos géneros presentaron valores bajos de desviación estándar lo que nos indicaría que los resultados son estables (Tabla 14 y 16).

Para el género de *Bacillus*, se encontró que de las 23 cepas aisladas, 8 presentaron antagonismo frente a *Lasiodiplodia theobromae* (34,8%), 7 cepas presentaron antagonismo frente a *Colletotrichum gloeosporioides* (30,4%) y solo 1 cepa presentó antagonismo frente a *Phytophthora sp.* (4,3 %), asimismo 6 cepas presentaron antagonismo tanto a *Fusarium sp.* como a *Alternaria sp.* (26,1 %).

El Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) de las cepas de *Bacillus* frente a los hongos fitopatógenos se muestran en la Tabla 14; la cepa IXB20 presentó el valor más alto (75 %) y fue frente a *Alternaria sp.*, mientras que el valor más bajo (45,7 %) lo presentó la cepa XB23 frente a *Lasiodiplodia theobromae*.

Los valores más altos de porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) para el género *Bacillus* fue de la cepa IXB20 que alcanzó valores de 75,0%, 67,4%, 60,9 % y 55,6 % para *Alternaria sp.*, *Lasiodiplodia teobromae*, *Phytophthora sp.* y *Fusarium sp.* respectivamente. Para *Colletotrichum gloeosporioides* el valor más alto fue 64,4 % producido por la cepa VB10.

En cuanto al género *Azotobacter* de las 29 cepas aisladas, 5 presentaron antagonismo antifúngico frente a *Lasiodiplodia teobromae* y *Phytophthora sp.* (17,2 %), 6 frente a *Colletotrichum gloeosporioides* (20,7 %), 12 frente a *Fusarium sp.* (41,4 %) y 11 frente a *Alternaria sp.* (37,9 %). En la Tabla 16 se muestra el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) de las cepas de *Azotobacter* frente a los hongos fitopatógenos; el valor más alto registrado es 67,4% de la cepa IIIA5 y frente a *Lasiodiplodia teobromae*, mientras que el valor más bajo 17% se registró para la cepa IIIA6 frente a *Fusarium sp.* Para *Colletotrichum*

gloeosporioides el porcentaje de inhibición más alto fue 66,7% presentado por la cepa IIIA5, mientras que para *Phytophthora sp.* el porcentaje de inhibición más alto fue 65,2% que se registró para la cepa VIIA19, y para los hongos *Fusarium sp.* y *Alternaria sp.* el valor máximo fue 60% en ambos casos debido a la cepa IVA7.

6.5.2 Solubilización de fosfatos

Se debe tener como criterio de selección la presencia de un halo de aclaración mayor de 5 mm alrededor de la colonia (Figura 10), es por ello que muchas cepas aunque fueron capaces de crecer y formar un ligero halo de 2 mm o menor de 5 mm de diámetro no fueron seleccionadas (Vásquez *et al.*, 2000),

De las 23 cepas del género *Bacillus* solo 7 (30,4%) presentaron capacidad solubilizadora de fosfatos (Tabla 17). Mientras que para el género *Azotobacter* 18 de las 29 cepas es decir el 62,1 % mostraron capacidad solubilizadora de fosfatos (Tabla 18). En todos los casos la capacidad solubilizadora de fosfatos fue considerada como moderada.

6.5.3 Prueba de la producción de Ácido Indol Acético (AIA)

Los resultados obtenidos para esta prueba se presentan en las Tablas 17 y 18. Las cepas que producen ácido indol acético lograron virar el medio a color rojo a diferencia de las cepas negativas (Figura 11). Para el género *Bacillus* 9 de las 23 cepas aisladas dieron positivo es decir 39,1%; mientras que para el género *Azotobacter* 19 de las 29 cepas aisladas fueron positivas, es decir 65,5 %.

6.5.4 Prueba de Capacidad Potencial de Fijación de Nitrógeno

Todas las cepas lograron crecer en el medio libre de nitrógeno, demostrando así su capacidad de fijación de nitrógeno, los diámetros de las colonias a los 15 días de lectura tuvieron valores entre 15 y 30 mm de diámetro esto en el caso de las cepas

del género *Bacillus*, y entre 14 y 28 mm para el género *Azotobacter* (Figura 12). Estos resultados se pueden observar en las Tablas 17 y 18 respectivamente.

6.6 Selección de cepas con mejores resultados para el diseño de los tipos de bioinoculantes

Después de obtener todos los resultados de las pruebas anteriores se llevó a cabo la selección de las cepas con mejores resultados, para ello se eligió a aquellas que lograron inhibir el crecimiento de 3 o más hongos fitopatógenos y que dieron positivo a por lo menos una de las otras tres pruebas que se les realizó.

En la Tabla 17 y 18 se muestran las cepas y sus resultados para *Bacillus* y *Azotobacter* respectivamente; para el género *Bacillus*, las cepas seleccionadas fueron IIB4, IIIB6, VB10, VB11, VIIB16, IXB20, y XB23, en el caso de *Azotobacter*, se seleccionó a las cepas IIIA5, IVA7, VA12, VIIA19 y VIIIA24.

Todas las cepas seleccionadas al ser sembradas juntas en diferentes combinaciones, no mostraron antagonismo entre sí, lo cual se evidencio al crecer juntas una misma placa (Figura 13).

Con las cepas seleccionadas de ambos géneros, se diseño 7 tipos de bioinoculantes cada uno con 2 cepas diferentes, a los que se les codificó tal como se aprecia en la Tabla 19, los mismos que se probaron a nivel de almácigo.

6.7 Evaluación de los diferentes tipos de bioinoculantes a nivel de almácigo

Los resultados de los 7 tipos de bioinoculantes usados para las pruebas a nivel de almácigo se muestran en la Tabla 20.

Para todos los casos en los que las semillas no se inocularon el tiempo de germinación fue de 15 días, y para aquellos en los que se usó bioinoculante el tiempo de germinación fue de 11 a 14 días. Los bioinoculantes B3 y B6, redujeron 26,6% es decir 4 días del tiempo de germinación común, siendo este el mayor porcentaje registrado; mientras que el tratamiento B4 sólo redujo 4 % o sea 1 día

del tiempo de germinación común, siendo este el menor porcentaje registrado en este estudio.

El número de hojas de las plantas que germinaron de semillas inoculadas fue mínimo 6 y máximo 9, mientras que las plantas de semillas que no se inocularon presentaron 4 o 5 hojas.

Con respecto a la medida de la altura del tallo se registró un mínimo de 26 cm y un máximo de 35 cm en plantas de semillas inoculadas. Para plantas de semillas no inoculadas el mínimo fue 22 cm y el máximo fue 24 cm.

Con respecto a la presencia de micosis, en todas las plantas que germinaron de semillas inoculadas no se observa síntomas de micosis (Figura 16), mientras que en las plantas de semillas que no se inocularon se presenta síntomas de micosis (Figura 15).

VII. DISCUSION

La mejor forma de garantizar la producción y el crecimiento de un alimento orgánico en el Perú, será mediante la aplicación de la agricultura ecológica basada en la utilización óptima de los recursos naturales de manera sostenible y equilibrada. Esto es, obtener alimentos saludables de mayor calidad nutritiva sin la presencia de sustancias de síntesis química y obtenida mediante procedimientos sustentables, como el uso de bioinoculantes microbianos.

En la presente investigación se lograron obtener 23 cepas del género *Bacillus*, y 29 cepas del género *Azotobacter*, de la rizósfera de plantaciones del cultivo de mango *Mangifera indica* L., del valle de San Lorenzo – Piura, una zona tropical.

No se encontraron referencias bibliográficas respecto a microorganismos de rizósfera de plantaciones de mango es por ello que la discusión de los resultados será con reportes similares de *Bacillus* y *Azotobacter* en otras especies vegetales. Los resultados de esta investigación coinciden con lo encontrado por otros investigadores como Jiménez (2007) y Torriente (2010), quienes indican que el género *Azotobacter* se encuentran en gran proporción en la rizósfera de suelos tropicales que se caracterizan por poseer altos contenidos de materia orgánica, fosfatos y valores de pH cercanos a la neutralidad. Por otra parte los investigadores Sosa *et al.* (2005), Orberá (2009), Venner y Martín (2009) y Calvo (2010), señalan que el género *Bacillus* es un género altamente presente en la rizósfera de diversos cultivos; además este género debido a su capacidad de formación de esporas tiene una ventaja de supervivencia en la rizósfera vegetal.

La capacidad promotora del crecimiento vegetal de las rizobacterias aisladas en esta investigación, fue evaluada *in vitro* mediante diversas pruebas fundamentales para determinar microorganismos con propiedades PGPR, tal como lo señala Husen (2003) y Joseph *et al.* (2007).

La primera de las pruebas realizadas fue la de antagonismo contra fitopatógenos que afectan el cultivo de mango. Con respecto al tema de la procedencia de las cepas, hay que recordar que las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) tienen propiedades lo que les confiere una capacidad especial y los señala como mejores controladores de fitopatógenos a diferencia de cepas estandarizadas que están en otros lugares y que a su vez presentan antagonismo (Puente *et al.*, 2009; Bach y Díaz, 2008).

Para el género de *Bacillus*, se encontró que de las 23 cepas aisladas 8 cepas (34,8 %) dieron antagonismo frente al menos 1 de los 5 hongos fitopatógenos a los que se les enfrentó; de las cuales 50 % fue antagonista frente a 4 hongos, 25 % frente a 3 hongos, 12,5 % fue antagonista a sólo un hongo y 12,5 % fue antagonista a los 5 hongos a la vez. La capacidad de las especies del género *Bacillus* de ser antagonista a más de un fitopatógeno a la vez ya ha sido reportada antes, y esto puede deberse al hecho de que éstas son de una misma especie y pueden exhibir diferentes capacidades para producir toxinas e inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos (Di Pietro *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1999). El mecanismo de antibiosis es generalmente el modo de antagonismo observado en *Bacillus* sp (Edwards *et al.*, 1994). La mayoría de las cepas del género *Bacillus* producen muchas clases de antibióticos como bacilomicina, fungimicina y micosubtilina que son efectivos en suprimir el crecimiento de patógenos *in vitro* y/o *in situ* (Pa y Gardener, 2006). De hecho, los *Bacillus* actúan vía antibiosis, por competencia de nutrientes, sitios de exclusión e infección, parasitismo y/o inducción de resistencia (Arras y Arru, 1997; Kloepper *et al.*, 2004).

Los valores más altos de porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los *Bacillus* frente a los hongos fitopatógenos fueron para *Alternaria* sp, *Lasiodiplodia teobromae* y *Fusarium* sp de 75,0%, 67,4% y 55,6 %

respectivamente, todos producidos por la cepa IXB20; y para *Colletotrichum gloeosporioides* el valor más alto fue 64,4 % producido por la cepa VB10. Estos valores de inhibición tan altos registrado para los *Bacillus* es debido a que las bacterias pertenecientes a este género se caracterizan por tener la capacidad de producir sustancias antagonistas, tales como, metabolitos, antibióticos, enzimas líticas, entre otras, que son una valiosa alternativa al control químico, que tanto se ha encarecido a nivel internacional y del cual existe una tendencia cada vez más generalizada a disminuir su uso, debido precisamente a los daños que ha causado al hombre y al medio ambiente tal como lo señalan investigadores como Sosa *et al.*, (2005) y Gutiérrez *et al.*, (2003).

Al comparar los resultados de este trabajo con los reportados por otros investigadores se encontró que el porcentaje de cepas con capacidad antagonista y los valores de porcentaje de inhibición hallados en esta investigación son en la mayoría de los casos valores altos.

Ros *et al.*, (2008) reporta 2,9 % de cepas antagonistas frente a *Phytophthora sp*, valor menor al 4,3 % encontrado en esta investigación, pese a que trabajó con 102 cepas; en este caso la procedencia de los *Bacillus* aisladas por Ros *et al.*, (2008) fue el suelo y no la rizósfera y como ya se sabe los microorganismos presentes en la rizósfera son generalmente diferentes a los microorganismos presentes en otra zona del suelo por el hecho de interactuar en forma compleja con las raíces de la planta y poseer propiedades PGPR tal como señala Bach y Díaz (2008).

Orberá *et al.*, (2009) quien trabajó con 36 cepas del género *Bacillus* aisladas de rizósfera de plantas ornamentales, señala que 13,9% mostraron antagonismo frente a *Colletotrichum sp* y *Fusarium oxysporum*; en esta investigación se encontró que de 23 cepas 30,4% mostraron antagonismo frente a *Colletotrichum gloeosporioides*

y 26,1 % frente a *Fusarium sp* porcentajes mayores pese a que se trabajó con menos cepas.

Mojica *et al.*, (2009) reporta 29,7 % de cepas de *Bacillus thuringiensis* antagonistas frente a *Phytophthora capsici*; si bien en esta investigación se reporta solo 4,3% de cepas del género de *Bacillus* antagonistas frente a *Phytophthora sp*, se debe tener presente el número y la procedencia de las cepas con las que se trabajó, ya que Mojica *et al.*, (2009) trabajó con un total de 64 cepas que procedían de una colección internacional y no se puede determinar si fueron cepas de rizósfera.

Respecto al porcentaje de inhibición de crecimiento radial de las cepas de *Bacillus* frente a los hongos fitopatógenos, se encontró valores entre 45,7 % y 75 %, en este caso los valores hallados son mayores a los reportados.

Lagunas *et al.*, (2001) reportan a *Bacillus firmus* con un porcentaje de inhibición de 33,8 a 41,0 % frente a *Phytophthora capsici*, valores menores a los que se encontró en este trabajo que fue de 60,9%. Por su parte Orberá *et al.*, (2009) para las cepas de *Bacillus* frente a *Colletotrichum sp* reporta 51,6 a 60,8 % como porcentaje de inhibición, en esta investigación se registró 56,8 a 64,4%; mientras que para *Fusarium oxysporum* el valor registrado fue 67,9 a 72,2 % en este caso es mayor al registrado en esta investigación, pues las cepas de *Bacillus* mostraron valores de 48,6 a 55,6 %. A su vez Mojica *et al.*, (2009) señala para *Bacillus thuringiensis* un porcentaje de inhibición de 15,1 a 27,8 % frente a *Phytophthora capsici*, el cual es más de dos veces menor al que registra esta investigación, ya que el porcentaje de inhibición de *Bacillus* frente a *Phytophthora sp.*, fue 60,9%. Hernández *et al.* (2006) quienes trabajaron con 5 cepas del genero *Bacillus* aisladas de rizósfera de papa y chile y encontraron un porcentaje de inhibición máximo de 53,4% frente a *Alternaria dauci* patógeno del cultivo de zanahoria, este valor es menor al máximo encontrado en este trabajo que fue 75%.

En cuanto al género *Azotobacter* de las 29 cepas aisladas, 82,8% presentaron antagonismo antifúngico frente a fitopatógenos del cultivo de mango; este porcentaje es mayor en comparación al 34,8% registrado para las cepas del género *Bacillus* aisladas en este estudio, lo que nos indicaría que la rizósfera de mango es una fuente importante de cepas de *Azotobacter* con capacidad antagonista. Al comparar el porcentaje de cepas aisladas en esta investigación que son antagonistas frente a hongos fitopatógenos, se tiene que el género *Bacillus* presenta un mayor porcentaje de cepas antagonistas en comparación con el género *Azotobacter* respecto a los dos hongos más importantes que afectan al cultivo de mango en nuestro país *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia theobromae*, pero el género *Azotobacter* muestra un mayor porcentaje de cepas antagonistas frente a los hongos *Phytophthora sp*, *Fusarium sp* y *Alternaria sp*, por lo que el banco de cepas que se ha generado con este estudio es un gran aporte a la línea de investigación para formular controladores biológicos de hongos fitopatógenos.

Los valores del porcentaje de inhibición encontrados para las cepas del género *Azotobacter* son similares a los que se encontró para el género *Bacillus*, lo cual confirma al género *Azotobacter* como una rizobacteria promotora de crecimiento vegetal PGPR con importante capacidad biocontroladora de hongos fitopatógenos, tal como lo señalan Jiménez (2007) y Rico (2009)

Por otro lado, el porcentaje de inhibición registrado en este estudio para el género *Azotobacter* frente a *Fusarium sp* fue mayor en comparación al reportado por Rico (2009) quien señala 48% de inhibición de *Azotobacter* frente a *Fusarium solani*.

En este estudio se encontraron 2 cepas con un potencial importante en la capacidad biocontroladora, pues mostraron porcentajes de inhibición por encima de 50 % y además fueron antagonistas a más de un hongo a la vez. Estas cepas son:

la cepa IXB20 del género *Bacillus* que fue antagonista a los 5 hongos evaluados en este estudio y la cepa IVA7 del género *Azotobacter* que fue antagonista a 4 de los 5 hongos que se evaluó.

La capacidad que poseen algunas bacterias habitantes de la rizósfera para solubilizar fosfato, les permite ser consideradas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal, especialmente aquellas que se encuentran en suelos con grandes cantidades de fosfato precipitado que no es disponible para las plantas (Chatli *et al.*, 2008). Los microorganismos solubilizadores de fósforo liberan ácidos orgánicos que disuelven los fosfatos insolubles haciéndolos disponibles para las plantas por lo que son considerados de gran importancia dentro de la microflora del suelo, diversos estudios realizados por Valero (2003), Oviedo e Iglesias (2005), Chirinos *et al.*, (2006) y Cuervo (2010), señalan a los géneros *Azotobacter* y *Bacillus* como importantes solubilizadores de fosfato. En este estudio se encontró que de las cepas de *Azotobacter* 62,1% mostró capacidad solubilizadora de fosfato porcentaje mayor al que se registró para *Bacillus* 30,4%. Los resultados obtenidos respecto a *Azotobacter* 62,1% son mayores en comparación a los reportados por Rico, (2009), quien señala haber encontrado cerca del 50% de cepas de *Azotobacter* con capacidad solubilizadora de fosfato.

Las bacterias de la rizósfera, representan una alternativa para mejorar el aporte nutricional de las plantas; uno de los efectos benéficos que se destacan es la secreción de reguladores de crecimiento de plantas como auxinas que actúa mejorando los procesos de germinación de semillas, nutrición, desarrollo de raíces etc. Dentro de las hormonas promotoras del crecimiento vegetal, de tipo auxina se destaca al ácido Indol Acético (AIA), la cual ha sido encontrada en diversas bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus* tal como señalan, Mrkovacki y Milic (2001), Tsavkelova *et al.*, (2006) y Rico (2009).

Para la prueba de producción de ácido indol acético, los resultados señalan que 65,5% de las cepas de *Azotobacter* y 39,1% de las cepas de *Bacillus*, tienen la capacidad de formar ácido indol acético. Teniendo en cuenta que en esta investigación se trabajó con 29 cepas de *Azotobacter* en comparación con Rico, (2009) que trabajo con 62 cepas, y encontró 65,5 % de cepas productoras de ácido indol acético valor mayor al 56 % reportado por esta investigadora, se puede decir que la rizósfera de mango es una fuente importante de bacterias solubilizadoras de fosfato.

El nitrógeno generalmente es considerado el nutriente más limitante para el crecimiento de las plantas en su ambiente natural. Hoy en día la fijación de nitrógeno cobra más valor, dentro de contexto de la agricultura sostenible, ya que se puede evitar el uso exagerado de fertilizantes nitrogenados con el consiguiente ahorro en el consumo de energía y la disminución de la degradación del medio (Anderson, 2003), por ello que una de las características que se busca en las PGPR es la fijación de nitrógeno. Al evaluar la capacidad de fijar nitrógeno de las cepas aisladas de la rizósfera de mango, se encontró que todas las cepas de *Azotobacter* y *Bacillus*, fueron capaces de crecer en el medio libre de nitrógeno, lo que nos indica que pueden fijar este elemento, los diámetros de las colonias a los 15 días tuvieron valores similares en ambos géneros.

Aguirre *et al.*, (2009) y Chirinos *et al.*, (2006) señalan que los bioinoculantes son componentes vitales de los sistemas sustentables, ya que constituyen medios económicamente atractivos y ecológicamente aceptables para reducir los insumos externos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos, mediante la utilización de microorganismos debidamente seleccionados por su alta eficiencia e inocuidad, además pueden ser generados a partir de recursos locales y tener carácter endógeno. En todos los casos pueden utilizarse en los cultivos anuales, las

praderas de gramíneas y leguminosas, hortalizas y frutales. Es por ello que en nuestra investigación se buscan cepas que tengan propiedades requeridas para formular bioinoculantes que puedan usarse en el cultivo de mango orgánico.

Después de realizar las pruebas PGPR fundamentales a las cepas de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus*, se escogió las mejores cepas; 5 para del género *Azotobacter* y 7 del género *Bacillus*, estas cepas no mostraron posible antagonismo entre sí por lo que se diseñó bioinoculantes combinando dos cepas. Al hacer la evaluación a nivel de almácigo se observó que todas las plantas que crecieron a partir de semillas inoculadas con los bioinoculantes no presentaron síntomas visibles de micosis, a diferencia de las plantas control que provenían de semillas no inoculadas que si presentaron los síntomas visibles de micosis Figuras 16 y 17; esto evidencia el efecto biocontrolador de las cepas, propiedad que es muy reconocida en rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPR de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus*.

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPR son reconocidas en diversos estudios como bacterias que incrementan el crecimiento de las plantas, lo cual se evidencia la reducción del tiempo de germinación, incremento de la altura del tallo y número de las hojas en las plantas (Sánchez *et al.*, 1997; González *et al.*, 2000; Galindo *et al.*, 2006)

Todos los bioinoculantes evaluados lograron reducir el tiempo de germinación, e incrementar el número de hojas y la altura del tallo, respecto a los controles donde no se uso inoculantes. Los bioinoculantes B3 y B6, redujeron 26,6% es decir 4 días del tiempo de germinación común, siendo este el mayor porcentaje registrado; así mismo el mayor número de hojas se registro para los bioinoculantes B6 y B7; y la mayor altura de tallo se registró para el bioinoculante B1. Estos resultados confirman a las rizobacterias de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus* como una de las mejores alternativas para la elaboración de bioinoculantes para desarrollar una agricultura ecológica y económicamente rentable.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se concluye que se puede aislar bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus* de la rizósfera del cultivo de mango.
2. De la presente investigación se concluye que *Azotobacter* presenta mayor capacidad de antagonismo frente a los hongos *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides*; en cambio *Bacillus* presenta mayor capacidad de antagonismo frente a *Alternaria* sp., y tanto *Azotobacter* como *Bacillus* mostraron igual capacidad de antagonismo frente a *Lasiodiplodia teobromae*.
3. Las cepas de *Azotobacter* presenta mayor capacidad tanto de solubilización de fosfatos como de producción de ácido indol acético respecto al género *Bacillus*.
4. Todas las cepas de *Azotobacter* y *Bacillus* aisladas de la rizósfera del cultivo de mango presentan la capacidad potencial de ser fijadores de nitrógeno.
5. De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de promoción del crecimiento, se pueden diseñar bioinoculantes formulados con cepas de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus*.
6. De acuerdo a los resultados obtenidos a nivel de almácigo, los bioinoculantes a base de cepas microbianas de *Azotobacter* y *Bacillus*, promueven el crecimiento vegetal y mejoran el cultivo de mango, al lograr reducir el tiempo de germinación, incrementar el número de hojas y la altura del tallo, y actuar como potenciales biocontroladores de fitopatógenos, pues evita la aparición de síntomas de micosis.
7. Las rizobacterias del género *Azotobacter* y *Bacillus* tienen potencial aplicación como bioinoculante en el cultivo de *Mangifera indica* L (mango)

IX. RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas fisicoquímicas del suelo muestreado, con el fin de obtener mayor información del agroecosistema y de esta forma conocer la función de las bacterias aisladas en este cultivo.
2. Realizar evaluaciones cuantitativas utilizando un medio líquido para determinar la capacidad de solubilización de fosfatos inorgánicos.
3. Evaluar los biofertilizantes a nivel de campo considerando más variables para determinar sus beneficios a nivel del crecimiento y producción de las plantas.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aguirre, J. F; Irizar, M. B.; Durán, A.; Grajeda, O. A.; Peña, M; Loredó, C. y Gutiérrez, A. 2009. Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur Campo Experimental Rosario Izapa. Folleto Técnico Núm. 5 Tuxtla Chico, Chiapas. 2-9p.
2. Anderson, T.H. 2003 Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Ag Ecosys Environ* 98:285-293.
3. Asociación Peruana de Productores y Exportadores de Mango (APEM). El mango peruano. <http://www.apem.org.pe/mango.htm>
4. Aquilanti L., Mannazzu I., Papa R., Cavalca L. y Clementi F. 2004. Amplified ribosomal DNA restriction analysis for the characterization of *Azotobacteraceae*: a contribution to the study of these free-living nitrogen-fixing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 57:197-206.
5. Arras, G. y S. Arru 1997. Mechanism of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 47: 97-120.
6. Arshad, M. y Frankenberger, W. 1998. Plant growth regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Adv Agron* 62: 45-151.
7. Atlas, R. y Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4 ed. Madrid: Pearson educación. 413-417p.
8. Bach, T. y Díaz, M. 2008. Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en la Agricultura. *Agricultura Orgánica* 3: 35-40.
9. Barea, J.; Pozo, M.; Azcon, C. (2005). Microbial cooperation in the rhizosphere. *J. Expe: Bot.* 56: 1778-1784.
10. Calvo, P. y Zúñiga, D. 2010. Caracterización Fisiológica de Cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la Rizósfera de Papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada* 9: 1-9.

11. Carrillo, J.A.; García, R.S.; Muy, M.D.; Sañudo, A.; Márquez, I.; Allende, R.; De la Garza, Z.; Patiño, M.; y Galindo, E. 2005. Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:24-32.
12. Cavaletti, L., Monciardini, P., Bamonte, P. y Schumann, P. 2006. New lineage of filamentous, spore-forming, gram-positive bacteria from soil. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4360-4369.
13. Celis, L. y Ricardo, I. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Tesis para optar al título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología agrícola y veterinaria. Bogotá, D. C. Colombia.
14. Chaikiattigos, S.; Pongsomboon, W.; Dasanonda, M. y Anupunt P. 1997. Floral sex expression of khieo Sawoei and Nam Dok Mai mangoes grown in tropical and subtropical climates in Thailand. *Acta Horticulturae*. 455: 202-208.
15. Chamorro, E. 2006. Evaluación de la Efectividad Biocontroladora de *Bacillus subtilis* y dos cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre la incidencia y severidad del oidio de la vid (*Uncinula necator*) en *Vitis vinifera* variedad cabernet sauvignon. Memoria de título presentada para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Talca Facultad de Ciencias Agrarias Escuela de Agronomía. Talca, Chile.
16. Chatli A.S., Beri V. & Sidhu B.S. 2008. Isolation and characterization of phosphate solubilizing microorganisms from the cold desert habitat of *Salix alba* Linn. in trans Himalayan region of Himachal Pradesh. *Indian Journal of Microbiology*. 48: 267-273.

17. Chirinos, J.; Leal, A. y Montilla, J. 2006. Uso de Insumos Biológicos como Alternativa para la Agricultura Sostenible en la Zona Sur del Estado Anzoátegui. Revista digital CENIAP HOY 11: 3 - 7.
18. Choi, K.C., C. Young., S.H. An y B. Yook (1999). Effects of antagonistic bacteria and soil borne pathogenic fungi on growth of pasture plant seedlings. Korean Journal of Dairy Science 21: 41-48.
19. Corkidi, G.; Sangabriel J. C., Rojas, A.; Balderas, A.; Serrano, L. y Galindo, E. 2009. De mangos y sus manchas. México: Instituto de Biotecnología, UNAM Campus Morelos.
20. Crowley, D.E.; Wang, Y.; Reid, C. y Szaniszlo, P. 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. Plant Soil 130: 179-198.
21. Cruzado, J. J. 2009. Situación de la Producción de Mango en la Costa Norte Campañas 2007-2008 y 2008-2009. 1ed. Lima, Perú: Ministerio de Agricultura. 1-3 p.
22. Cuervo, J. P. 2010. Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Tesis para optar al título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología agrícola y veterinaria. Bogotá, D. C. Colombia.
23. Cumare, J y Avilan, L.1994. Descripción y caracterización de nueve variedades de mango a ser usados como patrones. III Estudio fenológico. Agronomía Tropical 44:417-439.
24. Daban, M. 2004. La Agricultura Sostenible, mucho más que una tendencia. Ecotrópica, en portada.. RUBES. Editorial y del ICTA (UAB). España. p. 1-3.

25. De Freitas, J., Banerjee, M. y Germida, J. 1997. Phosphates solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus up take of canola (*Brassica napus* L.). *Biological Fertilizer Soils* 24: 358- 363.
26. Di Pietro, D., M.R. Gut., J.P. Pachlatko y A. Schwinn (1991). Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off. *Phytopathology* 82: 131-135.
27. Dobbelaere S.; Vanderleyden, J. and Okon, Y., 2003. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 22:107-149.
28. Duran Zuazo, V.; Martinez Raya, A. y Aguilar Ruiz, J. 2003. Salt tolerance of mango rootstocks (*Mangifera indica* L. cv. Osteen). *Spanish Journal of Agricultural Research* 1: 67-78.
29. Edwards, S.G., T. McKay y B. Seddon 1994. Interaction of *Bacillus* species with phytopathogenic fungi-Methods of analysis and manipulation for biocontrol purposes. En: Blakeman J.P. and Williamson B. (ed). *Ecology of Plant Pathogens*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. p. 101-118.
30. Ezziyani, M.; Pérez C.; Requena M. E.; Rubio L.; Candela M. E. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* Ziyani, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora Capsici*. *Anales de Biología* 26:69-78, España.
31. FAOSTAT (2002). Base estadística de producción mundial y rendimiento. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
32. Fondo de Tecnología Agraria (FTA). 2007. Propuesta de Subproyecto de Servicios de Extensión (Tipo II). Mejoramiento productivo y fortalecimiento institucional para la exportación de mango orgánico al comercio justo, de la Asociación de Productores Agrarios de Pedregal. *CONCURSO N° 001-2007-PIPEA-INCAGRO*.

33. Franco A. y Dobereiner J. 1994. Biología do solo e a sustentabilidade de dois solos tropicais. Sao Paulo, Brasil. Summa Phytopathologica. 20: 68-74.
34. Franco, M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomycetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Granada, España.
35. Galán, V. 1990. Los frutales tropicales en los subtrópicos. Aguacate, Mango, Litchi y Longan. Madrid, España: Mundi Prensa. 130-133p.
36. Galán, V. 2000. The mango in latinoamerica. Acta horticulturae. 509:123-131.
37. Galindo T.; Polanía, J.; Sánchez, J.; Moreno, N.; Vanegas, J. y Holguín, G. 2006. Efecto de inoculantes microbianos sobre la promoción de crecimiento de plántulas de mangle y plantas de *citrullus vulgaris* San Andrés isla, Colombia. Acta Biológica Colombiana. 11:83 - 97
38. Glick BR 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol.41: 109-117.
39. Gryndler, M. 2000. Interactions of arbuscular micorrhizal fungi with other soil organism. In: Arbuscural micorrizas: physiology and function. Y Kapulnick and D.D Douns Jr. (eds). Kluwer Academic Press. 239-262p.
40. González, E.; Umaña, G. y Arauz, L. F. 1999. Fluctuación poblacional *Botryodiplodia theobromae* Pat. en Mango. Agronomía Costarricense 23: 21-29.
41. González, M. 2000. Efecto de un inoculante microbiano a partir de cepas nativas de *Azotobacter chroococcum* sobre el rendimiento en secuencias de cultivos hortícolas. Tesis presentada en opción al grado de Máster en Fertilidad del Suelo. Universidad de Camagüey. Instituto de suelos. Camagüey, Cuba.

42. Govender, V.; Korsten, L.; and Sivakumar, D. 2005. Semicommercial evaluation of *Bacillus licheniformis* to control Mango postharvest diseases in South Africa. *Postharvest Biology and Technology* 38:57-65.
43. Guevara, M., Tamayo, D., González, S., Páez, E., Oseguera, J. y Núñez, A. 1998. Estudio entomofarmacológico del extracto de *Manguífera indica* L. Primer Congreso Internacional Farmacológico. Memorias, La Habana, Cuba. p. 45.
44. Gutiérrez, J. G.; Gutiérrez, O.; Nieto, D.; Téliz, D.; Zavaleta, E.; Delgadillo, F. y Vaquera, H. 2003. Evaluación in Vitro de Agentes Biológicos y Físicos para el Control de *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) penz. y sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 199-206.
45. Gutiérrez, J. G.; Gutiérrez, O.; Nieto, D.; Téliz, D.; Zavaleta, E. y Delgadillo, F. 2004. Manejo integrado de la antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Penz. Y sacc. Del mango (*Mangifera indica* L.) Durante la postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 395-402.
46. Hernández, A.; Plana, R.; Martín, G.; Santander, L. 2002. . Estudio de algunos géneros microbianos asociados a diferentes variedades de trigo (*triticum aestivum* L.) en suelo ferralítico rojo. *Cultivos Tropicales* 23: 15-20.
47. Hernández, FD; Aguirre, Adalberto; Lira, RH.; Guerrero, E.; Gallegos, G. 2006. Bioeficacia de productos orgánicos, biológicos y químicos contra *Alternaria dauci* Kühn y su efecto en el cultivo de zanahoria. *Revista Internacional de Botánica Experimental ΦYTON* 75: 91-100.
48. Hernández Lauzardo, A.; Bautista, S.; Gerardo, M. y Hernández, A. 2007. Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25: 66-74.
49. Holt J. 2000. *Bergey's manual to determinative bacteriology*. Novena Edicion. Baltimore. Maryland. Ed Williams & Wilikins. USA. p. 77,105, 118, 135.

50. Health Protection Agency (HPA). 2004. National Standard Method: Identification of *Bacillus* species. Inglaterra.
51. Husen, E. 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. Indonesian Journal of Agricultural Science 4: 27-31.
52. Jiménez, D. J. 2007. Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter spp.* Mediante el Análisis de Restricción del DNA Ribosomal 16s. Tesis para optar el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología Industrial. Bogotá, D. C. Colombia.
53. Joseph, B., Ranjar, R. & Lawrence, R. 2007. Characterization of plant growth promoting rizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). International Journal of Plant Production 2: 141-151.
54. Kennedy, C., Rudnick, P., Mc Donald, M., & Melton, T. 1901. Genus III. *Azotobacter* Beijerinck., 567AL. En: Bergey. 2005. Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Brenner, J. Ed. Springer. New-York, USA.
55. Kizilkaya R. 2008. Yield. response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. Ecological Engineering. 33: 150-156.
56. Kloepper, J.W., C.M. Ryn y S. Zhang 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* sp. Phytopathology 94: 1259-1266.
57. Kumar V, Kumar R, Narula N. 2001. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. Microbiological Research. 156: 87-93.
58. Lagunas, J.; Zavaleta, E.; Osada, S.; Aranda, S.; Luna, I.; Vaquera, H. 2001. *Bacillus firmus* como Agente de Control Biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Mexicana de Fitopatología. 19: 57- 65.

59. Loredó, C.; López, L. y Espinosa, D. 2004. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal Asociadas con Gramíneas: una revisión. *Terra Latinoamericana* 22: 225-239.
60. Lozano T. María Denis; Rozo Wilches Luis Segund; Ruiz Quiñónez Nataly; Quiroga Luisa F.; Sandoval Lozano Luis A. 2008. Manual del manejo preventivo de la Secadera (*Fusarium* sp) en el cultivo de Maracuyá. 21-31p.
61. Maldonado, E. y Álvarez L. 2007. *Colletotrichum acutatum* causando Antracnosis en Mango en la zona norte del Perú. *Revista Fitopatología*, 42: 44.
62. Manulis, S., Shafrir, H., Epstein, E., Lichter, A. & Barash I. 1994. Biosíntesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiology* 140: 1045-1050.
63. Marin V., Baldani V., Dos Santos R y Baldani I. 2003. Fixacao biológica de nitrógeno; Bacterias fijadoras de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria. 44 p. (Comunicado Técnico).
64. Márquez, F. J. 2007. Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo. Tesis para optar al Grado de Licenciado en Ciencias Biológicas. Universidad Austral de Chile Facultad de Ciencias Escuela de Ciencias. Valdivia, Chile.
65. Minaya, Alberto. 1999. El mango en el Perú y sus vínculos con el mercado internacional. 1. Ed. Lima, Perú: Ministerio de Agricultura ; [S.l.] : IICA, Centro Regional Andino, Agencia de Cooperación Técnica en Perú. 25-55p.
66. Mojica, V; Luna, H.; Sandoval, C.; Pereyra, B.; Morales, L.; González, N.; Hernández, C. y Alvarado, O. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. *FYTON*. 78: 105-110.

67. Mora, J.; Gamboa, J.; Elizondo, R. 2002. Guía para el cultivo del mango (*Mangifera indica*) en Costa Rica. 1 ed. San José de Costa Rica: Ministerio de Agricultura y Ganadería. 25.p
68. Morales, V. y Rodríguez, M. 2005. Hongos endófitos un nuevo paradigma para la Fitopatología. *Fitopatología. Revista Digital CENIAP HOY* 7: 1-3.
69. Morales, V. y Rodríguez, M. 2006. Hongos endofitos en plantaciones de mango 'Haden' de la planicie de Maracaibo, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 23: 273-283.
70. Mrkovacki, N. y Milic, V. 2001. Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application. *Annals of Microbiology* 51: 145-158.
71. Nogales, B. 2005. Microbiología del suelo en la era de la biología molecular: Descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas* 2: 1-10.
72. Núñez, R. y Davenport, T. 1991. Effect of duration of low temperatura treatment on flowering of containerized "Tommy Atkins" mango. *Scientia Horticulturae*. 26: 751.
73. Núñez, R. y Davenport, T. 1994. Flowering of mango trees in containers as influenced by seasonal temperatura and wáter stress. *Scientia Horticulturae*. 58: 57-66.
74. Núñez, R. y Davenport, T. 1995. Effect of leaf age, duration of cool temperature treatment, and photoperiod on bud dormancy release and floral initiation in mango. *Scientia Horticulturae*. 62: 63-73.
75. Núñez, A., Martínez, G., Delgado, R., León O., y Pérez, G. 1998. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de un extracto natural de *Mangifera indica* L. Primer Congreso Internacional Farmacológico. Memorias. Cd. De La Habana. p. 47.

76. Orberá, T.; Serrat, M. y González, Z. 2009. Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. *Fitosanidad*. 13: 95-101.
77. Oviedo, M. e Iglesias, M. 2005. Utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo en cultivo de raygrás. Argentina: Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones científicas y tecnológicas. Resumen: A-053.1-3p.
78. Pa, K.K. y B. M. Gardener 2006. Biological control of plant pathogens. En: *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHIA- 2006-1117-02.
79. Parrotta, John A. 1993. *Mangifera indica* L. Mango. SO-ITF-SM-63. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. p 6.
80. Pavez, I. y Alas, F. 2004. Foro internacional: Agronegocios de frutas tropicales. 1ed. San Salvador, El Salvador: IICA. 20, 79 p.
81. Peña, H. y Reyes, I. 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) *Interciencia*. 8: 23-30.
82. Petersohn A., Brigulla M., Haas S., Hoheisel J., Lker U. y Hecker M. 2001. Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 183: 5617–5631.
83. Protacio, C. 2000. A model for potassium nitrate-induced flowering in mango. *Acta Horticulture*. 509: 545-552.
84. Protacio, C.; Quinto, J.; Serrano, E.; Marquez, I. y Rodriguez, M. 2006. Unravelling the Mechanism of Mango Flowering. 8th International ISHS Mango Symposium. Sun City. South Africa. 5-10 February 2006. Book of Abstract: 59.
85. Puente, M. L.; García, J.; Rubio, E. y Peticari, A. 2009. Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal Empleados como inoculantes en Trigo. *Horizonte A*.23: 14-17.

86. Rahman, M. S.; Ano T. y Shoda M. 2006. Second Stage Production of Iturin A by Induced Germination of *Bacillus subtilis* RB14. EE.UU. Journal of Biotechnology. 18:226-229.
87. Rico, M. A. 2009. Capacidad Promotora de Crecimiento Vegetal por Bacterias del Genero *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas Altoandinas del Perú. Tesis para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Biología Celular y Genética. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Ciencias Biológicas.
88. Rivera J. C. 2009. Perspectivas de la Industria de Exportación de Mango Peruano. Piura, Perú: PROMPERU. 1-24.p.
89. Rodríguez, Ma. del P. 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. Acta Zool. Mex. 1: 53-78.
90. Ros, C.; González, N.; Arévalo, R.; Puertas A. 2008. Utilización de cepas bacterianas para el control *Phytophthora Nicotianae* Breda de Haan en el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Revista Electrónica Granma Ciencia 12: 1-10.
91. Sánchez, C., R. Rivera., C. González y R. Cupell. 1997. Efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococcum* sobre la germinación y desarrollo de las posturas de café. En: Resúmenes XI Seminario Científico INCA p. 182.
92. Sánchez Yáñez, J. 2004. Producción de bioinsecticida a base de *Bacillus thuringiensis*. Michoacán, México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas.
93. Santana, M.; Vásquez, C.; Martínez, M. y Franco, M. 2002. Evaluación de cepas de *Azotobacter spp.* y de bacterias solubilizadoras de fosfato (BFS), como biofertilizante mixto en cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum*

- morifolium* var. *Regal Suerte*). Tesis de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.
94. Sergent, E., E. Casanova y F. Leal. 1995. Aplicación de nitrógeno y potasio en mango (*Mangifera indica* L.). *Agronomía Tropical* 45: 293-312.
 95. Sergent E. 1999. El cultivo del Mango (*Mangifera indica* L) botánica, manejo y comercialización. 1 ed. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela. 150 p.
 96. Serrano L, y Galindo E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Revista Ciencia de la Academia Mexicana de Ciencias*. 58: 77-88.
 97. Sosa, A.; Pazos, V. y Torres, D. 2005. Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco. *Centro Agrícola* 32: 25-31.
 98. Tejera, N.; Lluch, C.; Martínez, M. y González, J. 2005. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil* 27: 223–232.
 99. Tilak, K., Ranganayaki, N., Pal, R., Saxena, K., Nautiyal, S., Mittal, S., Tripathi, A. y Johri, B. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science* 89: 136-150.
 100. Todar K. 2003. The genus *Bacillus*. University of Wisconsin–Madison, Department of Bacteriology. 1-10p.
 101. Torres M., Valencia S., Bernal J. y Martínez, P. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., Producers of Indole-3- Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42:171-176.
 102. Torriente, D. 2010. Aplicación de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal en el Cultivo de la Caña de Azúcar. *Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos Tropicales* 31: 19-26.

103. Tsavkelova, E., Yu, Klimova, S., Cherdyntseva, T. y Netrusov, A. 2006. Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42: 117-126..
104. Valero, V.N. 2003. Potencial biofertilizantes de bacterias diazotroficas y solubilizadoras de fosfatos al cultivo de arroz (orizana sativa L.). Tesis de Maesria. Universidad Nacional de Bogotá, Colombia. Facultad de Ciencias.
105. Vásquez, P; Holguín G.; Puente M.; Cortés A y Bashan Y. 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils* 30: 460-468.
106. Venner, C. y Martín, M. J. 2009. aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) con capacidad antagonica frente a *Fusarium* sp. p. 15-17.
107. Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586.
108. Villa, P.; Alfonso, I.; Rivero, J.; González, G. 2007. Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* bioantagonistas de hongos fitopatógenos del género *Fusarium*. Cuba. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 41: 52-56.
109. Wills, L.; Marler, T. 1993. Root and shoot growth patterns of “Julie” and “Keitt” mango trees. *Acta Horticulture* 341: 264-270.
110. Zahir AZ, Arshad M, Frankenbergt WT. 2004. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives in Agricultura. *Advances in Agronomy*. 81:97-108.

XI. ANEXOS

ANEXO 1: TABLAS

Tabla 1. Características generales del lugar de muestreo y naturaleza de las muestras de Rizósfera

Campo de cultivo/ variedad de mango	Muestras de suelo	Código de muestras	pH	Temperatura	Clase textural
A. “Chato”	1	I	7,2	28°C	franco arcillosa
	2	II	7,1	28°C	
B. “Rosado”	3	III	7,1	30°C	franco arcillosa
	4	IV	7,0	30°C	
C. “Criollo”	5	V	7,1	30°C	franco limosa
	6	VI	7,2	29°C	
D. “Haden”	7	VII	6,5	30°C	franco limosa
	8	VIII	6,0	30°C	
E. “Edward”	9	IX	7,0	30°C	franco arcillosa
	10	X	7,2	30°C	
Campo de cultivo/ altitud		68 msnm			

Tabla 2. Cepas del género *Bacillus* (n = 23) obtenidas de la rizósfera de mango.

Campo de cultivo	Muestra (código)	Nº de cepas	Cepas (código)	Porcentaje (%)
A	I	2	IB1	8,7%
			IB2	
	II	2	IIB3	8,7%
			IIB4	
B	III	4	IIIB5	17,4%
			IIIB6	
			IIIB7	
	IV	1	IIIB8	4,3%
IVB9				
C	V	2	VB10	8,7%
			VB11	
	VI	4	VIB12	17,4%
			VIB13	
VIB14				
D	VII	1	VIB15	4,3%
			VIIIB16	
	VIII	2	VIIIB17	8,7%
			VIIIB18	
E	IX	2	IXB19	8,7%
			IXB20	
	X	3	XB21	13,0%
			XB22	
XB23				
Total		23		100%

Tabla 3. Caracterización Cultural y Tinción Gram de las cepas de *Bacillus* aisladas de la rizósfera de mango.

Código	Gram	Forma		Morfología de la colonia			
		microscópica	Forma	Borde	superficie	consistencia	color
IB1	+	bacilar	irregular	digitiforme	opaca	cremosa	blanco
IB2	+	bacilar	irregular	digitiforme	opaca	cremosa	blanco
IIB3	+	bacilar	irregular	ondulado	opaca	cremosa	blanco
IIB4	+	bacilar	irregular	digitiforme	opaca	cremosa	crema
IIIB5	+	bacilar	irregular	ondulado	opaca	cremosa	blanco
IIIB6	+	bacilar	irregular	ondulado	opaca	cremosa	blanco
IIIB7	+	bacilar	irregular	digitiforme	opaca	cremosa	blanco
IIIB8	+	bacilar	irregular	ondulado	opaca	cremosa	crema
IVB9	+	bacilar	irregular	digitiforme	opaca	cremosa	blanco
VB10	+	bacilar	irregular	ondulado	opaca	cremosa	blanco
VB11	+	bacilar	irregular	digitiforme	opaca	cremosa	crema
VIB12	+	bacilar	irregular	ondulado	opaca	cremosa	blanco
VIB13	+	bacilar	irregular	aserrado	opaca	cremosa	crema
VIB14	+	bacilar	irregular	aserrado	opaca	cremosa	blanco
VIB15	+	bacilar	irregular	digitiforme	opaca	cremosa	blanco
VIIB16	+	bacilar	irregular	aserrado	opaca	cremosa	crema
VIIIB17	+	bacilar	irregular	ondulado	opaca	cremosa	crema
VIIIB18	+	bacilar	irregular	ondulado	opaca	cremosa	blanco
IXB19	+	bacilar	irregular	aserrado	opaca	cremosa	crema
IXB20	+	bacilar	irregular	ondulado	opaca	cremosa	blanco
XB21	+	bacilar	irregular	digitiforme	opaca	cremosa	crema
XB22	+	bacilar	irregular	ondulado	opaca	cremosa	blanco
XB23	+	bacilar	irregular	aserrado	opaca	cremosa	crema
<i>B.subtilis</i>	+	bacilar	irregular	ondulado	opaca	cremosa	blanco
Control							

Tabla 4. Diferenciación bioquímica de las cepas de *Bacillus* aisladas de la rizósfera de mango.

Cepas de <i>Bacillus</i>	Catalasa	Citrato	Nitrato	Almidón	Lecitinasa	Asimilación de azúcares	
						Glucosa	Manitol
IB1	+	-	+	+	-	+	+
IB2	+	-	+	+	-	+	+
IIB3	+	-	+	+	-	+	+
IIB4	+	-	+	+	-	+	+
IIIB5	+	-	+	+	-	+	+
IIIB6	+	-	+	+	-	+	+
IIIB7	+	-	+	+	-	+	+
IIIB8	+	-	+	+	-	+	+
IVB9	+	-	+	+	-	+	+
VB10	+	-	+	+	-	+	+
VB11	+	-	+	+	-	+	+
VIB12	+	-	+	+	-	+	+
VIB13	+	-	+	+	-	+	+
VIB14	+	-	+	+	-	+	+
VIB15	+	-	+	+	-	+	+
VIB16	+	-	+	+	-	+	+
VIIIB17	+	-	+	+	-	+	+
VIIIB18	+	-	+	+	-	+	+
IXB19	+	-	+	+	-	+	+
IXB20	+	-	+	+	-	+	+
XB21	+	-	+	+	-	+	+
XB22	+	-	+	+	-	+	+
XB23	+	-	+	+	-	+	+
<i>B.subtilis</i> (control)	+	-	+	+	-	+	+

Tabla 5. Codificación de cepas del género *Azotobacter* (n = 29) obtenidas de la rizósfera de mango.

Campo de cultivo	Muestra (código)	Nº de cepas	Cepas (código)	Porcentaje (%)		
A	I	3	IA1 IA2 IA3	10,3%		
	II	1	IIA4	3,4%		
B	III	2	IIIA5 IIIA6	6,9%		
			IVA7 IVA8 IVA9	10,3%		
	IV	3	VA10 VA11 VA12	10,3%		
			VIA13 VIA14 VIA15 VIA16	13,8%		
D	VII	6	VIIA17 VIIA18 VIIA19 VIIA20 VIIA21 VIIA22	20,7%		
			VIIIA23 VIIIA24 VIIIA25	10,3%		
			IX	2	IXA26 IXA27	6,9%
					X	2
			Total			

Tabla 6. Caracterización cultural y Tinción Gram de las cepas del género *Azotobacter* aisladas de la rizósfera de mango.

Código	Gram	Forma microscópica	Borde	Morfología de la colonia		
				superficie	consistencia	color
IA1	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
IA2	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
IA3	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
IIA4	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	Translúcida
IIIA5	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
IIIA6	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
IVA7	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
IVA8	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
IVA9	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VA10	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VA11	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VA12	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VIA13	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VIA14	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VIA15	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VIA16	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VIIA17	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VIIA18	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VIIA19	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VIIA20	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VIIA21	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VIIA22	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VIIIA23	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VIIIA24	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
VIIIA25	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
IXA26	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
IXA27	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
XA28	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
XA29	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida
<i>A. vinelandi</i> (control)	-	cocoide	regular	brillosa	mucoide	translúcida

Tabla 7. Diferenciación bioquímica de las cepas de *Azotobacter* aisladas de la rizósfera de mango.

Código	Catalasa	Oxidasa	Nitrato	Formación de quistes	Asimilación de azúcares		
					Glucosa	Fructosa	Maltosa
IA1	+	+	+	+	+	+	+
IA2	+	+	+	+	+	+	+
IA3	+	+	+	+	+	+	+
IIA4	+	+	+	+	+	+	+
IIIA5	+	+	+	+	+	+	+
IIIA6	+	+	+	+	+	+	+
IVA7	+	+	+	+	+	+	+
IVA8	+	+	+	+	+	+	+
IVA9	+	+	+	+	+	+	+
VA10	+	+	+	+	+	+	+
VA11	+	+	+	+	+	+	+
VA12	+	+	+	+	+	+	+
VIA13	+	+	+	+	+	+	+
VIA14	+	+	+	+	+	+	+
VIA15	+	+	+	+	+	+	+
VIA16	+	+	+	+	+	+	+
VIIA17	+	+	+	+	+	+	+
VIIA18	+	+	+	+	+	+	+
VIIA19	+	+	+	+	+	+	+
VIIA20	+	+	+	+	+	+	+
VIIA21	+	+	+	+	+	+	+
VIIA22	+	+	+	+	+	+	+
VIIIA23	+	+	+	+	+	+	+
VIIIA24	+	+	+	+	+	+	+
VIIIA25	+	+	+	+	+	+	+
IXA26	+	+	+	+	+	+	+
IXA27	+	+	+	+	+	+	+
XA28	+	+	+	+	+	+	+
XA29	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. vinelandi</i> (control)	-	cocoide		Regular	brillosa	mucoide	translúcida

Tabla 8. Crecimiento de *Bacillus* a diferentes temperaturas con respecto al control (28 °C) a los 15 días de incubación.

Cepas (n=23)	Crecimiento (%)			
	18 °C	25 °C	32 °C	28 °C (control)
IB1	89,1	91,5	85,4	100,0
IB2	86,5	100,0	86,3	100,0
IIB3	85,3	89,3	83,2	100,0
IIB4	100,0	100,0	100,0	100,0
IIIB5	75,9	85,4	76,4	100,0
IIIB6	78,9	98,1	68,9	100,0
IIIB7	79,3	87,3	79,2	100,0
IIIB8	100,0	100,0	100,0	100,0
IVB9	77,0	85,0	83,5	100,0
VB10	74,1	86,5	76,3	100,0
VB11	85,3	100,0	87,1	100,0
VIB12	74,3	88,0	73,2	100,0
VIB13	86,9	89,3	89,9	100,0
VIB14	79,9	81,4	80,5	100,0
VIB15	100,0	100,0	100,0	100,0
VIIB16	56,9	90,2	67,3	100,0
VIIIB17	74,5	100,0	75,3	100,0
VIIIB18	83,2	95,3	87,0	100,0
IXB19	74,3	88,0	73,2	100,0
IXB20	100,0	100,0	100,0	100,0
XB21	84,3	87,8	86,4	100,0
XB22	79,3	87,3	79,2	100,0
XB23	89,7	100,0	95,3	100,0

Tabla 9. Crecimiento de *Azotobacter* a diferentes temperaturas con respecto al control (28 °C) a los 15 días de incubación.

Cepas (n=29)	Crecimiento (%)			
	18 °C	25 °C	32 °C	28 °C (control)
IA1	80,5	84,6	87,5	100,0
IA2	85,8	93,6	95,7	100,0
IA3	88,3	84,5	89,3	100,0
IIA4	89,7	100,0	95,3	100,0
IIIA5	92,5	96,4	97,8	100,0
IIIA6	100,0	100,0	100,0	100,0
IVA7	80,0	94,2	98,1	100,0
IVA8	100,0	100,0	100,0	100,0
IVA9	97,9	96,5	98,9	100,0
VA10	84,5	97,3	94,1	100,0
VA11	73,2	100,0	97,5	100,0
VA12	85,3	90,4	89,5	100,0
VIA13	85,2	92,4	93,7	100,0
VIA14	93,6	99,2	99,0	100,0
VIA15	100,0	100,0	100,0	100,0
VIA16	84,3	87,8	86,4	100,0
VIIA17	100,0	100,0	100,0	100,0
VIIA18	92,1	95,3	96,5	100,0
VIIA19	90,5	100,0	99,3	100,0
VIIA20	90,8	94,6	97,3	100,0
VIIA21	100,0	100,0	100,0	100,0
VIIA22	87,8	97,3	97,9	100,0
VIIIA23	96,5	89,9	90,0	100,0
VIIIA24	100,0	100,0	100,0	100,0
VIIIA25	89,2	97,3	98,7	100,0
IXA26	100,0	100,0	100,0	100,0
IXA27	99,4	99,6	99,8	100,0
XA28	100,0	100,0	100,0	100,0
XA29	90,4	95,9	90,0	100,0

Tabla 10. Crecimiento de *Bacillus* a pH 5,5 y 7,5 con respecto al control a pH 7 a los 8 días de incubación.

Cepas (n=23)	Crecimiento (%)		
	5,5	7,5	7 (control)
IB1	78,3	84,4	100,0
IB2	65,4	86,5	100,0
IIB3	67,4	83,2	100,0
IIB4	68,9	86,4	100,0
IIIB5	70,2	80,4	100,0
IIIB6	78,9	83,9	100,0
IIIB7	59,1	70,3	100,0
IIIB8	60,5	98,2	100,0
IVB9	54,8	90,4	100,0
VB10	72,1	85,2	100,0
VB11	75,9	89,5	100,0
VIB12	68,9	79,9	100,0
VIB13	70,2	80,0	100,0
VIB14	65,9	90,0	100,0
VIB15	58,2	93,1	100,0
VIIB16	60,9	95,7	100,0
VIIIB17	71,0	87,1	100,0
VIIIB18	58,2	97,4	100,0
IXB19	58,4	100,0	100,0
IXB20	60,1	95,1	100,0
XB21	68,0	88,9	100,0
XB22	75,1	100,0	100,0
XB23	75,0	100,0	100,0

Tabla 11. Crecimiento *Azotobacter* de a pH 5,5 y 7,5 con respecto al control a pH 7 a los 8 días de incubación.

Cepas (n=29)	Crecimiento (%)		
	5,5	7,5	7 (control)
IA1	100,0	100,0	100,0
IA2	98,5	99,5	100,0
IA3	98,7	99,0	100,0
IIA4	100,0	100,0	100,0
IIIA5	99,2	99,5	100,0
IIIA6	78,4	100,0	100,0
IVA7	80,0	89,6	100,0
IVA8	75,3	99,4	100,0
IVA9	100,0	100,0	100,0
VA10	79,3	90,1	100,0
VA11	85,1	100,0	100,0
VA12	89,6	96,7	100,0
VIA13	89,0	95,3	100,0
VIA14	79,1	100,0	100,0
VIA15	77,5	100,0	100,0
VIA16	100,0	100,0	100,0
VIIA17	90,1	99,1	100,0
VIIA18	73,9	99,8	100,0
VIIA19	85,4	90,1	100,0
VIIA20	99,5	100,0	100,0
VIIA21	98,6	90,5	100,0
VIIA22	100,0	100,0	100,0
VIIIA23	93,9	98,2	100,0
VIIIA24	69,3	97,4	100,0
VIIIA25	89,0	100,0	100,0
IXA26	72,1	95,1	100,0
IXA27	75,9	88,9	100,0
XA28	100,0	100,0	100,0
XA29	70,9	98,1	100,0

Tabla 12. Pruebas de antagonismo antifúngico de *Bacillus sp* y *Azotobacter sp* en función del tiempo de exposición.

Hongos	Tiempo de lectura final (días)
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	4
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	6
<i>Phytophthora sp</i>	7
<i>Fusarium sp</i>	7
<i>Alternaria sp</i>	9

Tabla 13. Pruebas de antagonismo de las cepas del género *Bacillus* frente a los hongos fitopatógenos de mango.

Cepas (n=23)	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Phytophthora sp</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>Alternaria sp</i>
IB1	-	-	-	-	-
IB2	-	-	-	-	-
IIB3	-	-	-	-	-
IIB4	+	+	-	+	+
IIIB5	-	-	-	-	-
IIIB6	+	+	-	+	-
IIIB7	-	-	-	-	-
IIIB8	-	-	-	-	-
IVB9	-	-	-	-	-
VB10	+	+	-	+	+
VB11	+	+	-	+	+
VIB12	-	-	-	-	-
VIB13	-	-	-	-	-
VIB14	-	-	-	-	-
VIB15	-	-	-	-	-
VIIIB16	+	+	-	+	+
VIIIB17	+	-	-	-	-
VIIIB18	-	-	-	-	-
IXB19	-	-	-	-	-
IXB20	+	+	+	+	+
XB21	-	-	-	-	-
XB22	-	-	-	-	-
XB23	+	+	-	-	+
Total de cepas con antagonismo	8	7	1	6	6
Porcentaje	34,8%	30,4%	4,3 %	26,1 %	26,1 %

Tabla 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR)* de hongos fitopatógenos de mango por las cepas *Bacillus sp.*

Cepa	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Phytophthora sp</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>Alternaria sp</i>
IB1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IB2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IIB3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IIB4	56,5±0,1	62,2±0,2	0,0	53,1±0,2	64,3±0,3
IIIB5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IIIB6	56,5±0,2	62,2±0,2	0,0	50,0±0,1	0,0
IIIB7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IIIB8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IVB9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VB10	63,0±0,2	0,0	0,0	50,0±0,2	67,4±0,2
VB11	60,9±0,1	62,2±0,2	0,0	50,0±0,0	63,0±0,0
VIB12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VIB13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VIB14	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VIB15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VIIB16	63,0±0,3	60,0±0,1	0,0	48,6±0,2	50,0±0,0
VIIIB17	45,7±0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
VIIIB18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IXB19	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IXB20	67,4±0,3	56,8±0,2	60,9±0,1	55,6±0,2	75,0±0,2
XB21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
XB22	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
XB23	45,7±0,1	60,0±0,2	0,0	0,0	50,0±0,1

*PICR = $(R1 - R2)/R1 \times 100$. Donde R1 y R2 son los radios mayor y menor respectivamente de crecimiento radial

Tabla 15. Pruebas de antagonismo de las cepas del género *Azotobacter* frente a los hongos fitopatógenos de mango.

Cepa	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Phytophthora sp</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>Alternaria sp</i>
IA1	-	-	-	+	-
IA2	-	-	-	+	-
IA3	-	-	-	+	-
IIA4	-	-	-	+	+
IIIA5	+	+	-	+	-
IIIA6	+	-	-	+	-
IVA7	+	+	-	+	+
IVA8	-	-	-	+	+
IVA9	-	-	-	-	-
VA10	-	-	-	-	-
VA11	-	-	-	+	-
VA12	-	+	-	+	-
VIA13	-	-	+	-	+
VIA14	-	-	+	-	-
VIA15	-	-	+	-	-
VIA16	-	-	+	-	-
VIIA17	-	-	-	-	+
VIIA18	-	+	-	-	-
VIIA19	-	+	+	-	+
VIIA20	-	+	-	+	-
VIIA21	-	-	-	-	+
VIIA22	-	-	-	-	+
VIIIA23	-	-	-	-	-
VIIIA24	+	-	-	+	+
VIIIA25	-	-	-	-	-
IXA26	+	-	-	-	-
IXA27	-	-	-	-	+
XA28	-	-	-	-	-
XA29	-	-	-	-	+
Total de cepas con antagonismo	5	6	5	12	11
Porcentaje	17,2 %	20,7 %	17,2 %	41,4	37,9 %

Tabla 16. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR)* de hongos fitopatógenos de mango por las cepas *Azotobacter sp.*

Cepa	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Phytophthora sp</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>Alternaria sp</i>
IA1	0,0	0,0	0,0	21,8±0,2	0,0
IA2	0,0	0,0	0,0	17,4±0,2	0,0
IA3	0,0	0,0	0,0	31,9±0,1	0,0
IIA4	0,0	0,0	0,0	44,4±0,2	54,5±0,4
IIIA5	67,4±0,2	66,7±0,1	0,0	50,0±0,0	0,0
IIIA6	60,9±0,1	0,0	0,0	17,0±0,0	0,0
IVA7	60,1±0,1	58,3±0,3	0,0	60,0±0,2	60,0±0,0
IVA8	0,0	0,0	0,0	28,0±0,0	12,5±0,1
IVA9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VA10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VA11	0,0	0,0	0,0	40,0±0,2	0,0
VA12	0,0	25,0±0,0	0,0	50,0±0,0	44,4±0,2
VIA13	0,0	0,0	40,0±0,2	0,0	0,0
VIA14	0,0	0,0	50,0±0,2	0,0	0,0
VIA15	0,0	0,0	32,0±0,0	0,0	0,0
VIA16	0,0	0,0	40,0±0,0	0,0	0,0
VIIA17	0,0	0,0	0,0	0,0	41,2±0,2
VIIA18	0,0	56,7±0,3	0,0	0,0	0,0
VIIA19	0,0	44,0±0,0	65,2±0,2	0,0	23,5±0,1
VIIA20	0,0	20,0±0,1	0,0	21,8±0,2	0,0
VIIA21	0,0	0,0	0,0	0,0	37,5±0,3
VIIA22	0,0	0,0	0,0	0,0	31,3±0,4
VIIIA23	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VIIIA24	50,0±0,2	0,0	0,0	60,0±0,0	35,0±0,0
VIIIA25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IXA26	50,0±0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
IXA27	0,0	0,0	60,0±0,0	0,0	18,2±0,2
XA28	0,0	0,0	60,0±0,0	0,0	0,0
XA29	0,0	0,0	33,3±0,3	0,0	33,3±0,3

*PICR = $(R1 - R2)/R1 \times 100$. Donde R1 y R2 son los radios mayor y menor respectivamente de crecimiento radial

Tabla 17. Selección de cepas de *Bacillus* con capacidad promotora de crecimiento vegetal (PGPR) aisladas de rizósfera de mango.

Cepa (n=23)	Antagonismo antifúngico (Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial PICR [±])				Fijación de nitrógeno (mm)	Producción de ácido indol acético (AIA)	Solubilización de fosfatos (halo de inhibición [±])
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Phytophthora sp</i>	<i>Fusarium sp</i>			
IB1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
IB2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	+	-
IIB3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
IIB4	56,5±0,1	62,2±0,2	0,0	53,1±0,2	64,3±0,3	+	-
IIIB5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
IIIB6	56,5±0,2	62,2±0,2	0,0	50,0±0,1	0,0	-	-
IIIB7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
IIIB8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
IVB9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	+
VB10	63,0±0,2	0,0	0,0	50,0±0,2	67,4±0,2	+	+
VB11	60,9±0,1	62,2±0,2	0,0	50,0±0,0	63,0±0,0	+	+
VIB12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	+	-
VIB13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
VIB14	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
VIB15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
VIB16	63,0±0,3	60,0±0,1	0,0	48,6±0,2	50,0±0,0	+	+
VIIIB17	45,7±0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	+	+
VIIIB18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
IXB19	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	+	-
IXB20	67,4±0,3	56,8±0,2	60,9±0,1	55,6±0,2	75,0±0,2	+	+
XB21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
XB22	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	+
XB23	45,7±0,1	60,0±0,2	0,0	0,0	50,0±0,1	-	-

Halo de inhibición[±] solo se consideran positivas a aquellas cepas con halo de inhibición mayor de 5 mm

*PICR = (R1 – R2)/R1 x 100. Donde R1 y R2 son los radios mayor y menor respectivamente de crecimiento radial

Tabla18. Selección de cepas de *Azotobacter* con capacidad promotora de crecimiento vegetal (PGPR) aisladas de rizósfera de mango.

Cepa (n=23)	Antagonismo antifúngico (Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial PICR ⁼)				Fijación de nitrógeno Diámetro (mm)	Producción de		Solubilización de fosfatos (halo de inhibición=)
	<i>Lasioidiplodia theobromae</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Phytophthora sp</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>Alternaria sp</i>	ácido indol acético (AIA)		
IA1	0,0	0,0	0,0	21,8±0,2	0,0	14	-	+
IA2	0,0	0,0	0,0	17,4±0,2	0,0	16	-	-
IA3	0,0	0,0	0,0	31,9±0,1	0,0	19	-	+
IIA4	0,0	0,0	0,0	44,4±0,2	54,5±0,4	15	-	+
IIIA5	67,4±0,2	66,7±0,1	0,0	50,0±0,0	0,0	17	-	+
IIIA6	60,9±0,1	0,0	0,0	17,0±0,0	0,0	16	+	+
IVA7	60,1±0,1	58,3±0,3	0,0	60,0±0,2	60,0±0,0	28	+	+
IVA8	0,0	0,0	0,0	28,0±0,0	12,5±0,1	22	-	+
IVA9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16	+	+
VA10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	19	+	+
VA11	0,0	0,0	0,0	40,0±0,2	0,0	21	+	-
VA12	0,0	25,0±0,0	0,0	50,0±0,0	44,4±0,2	18	+	+
VIA13	0,0	0,0	40,0±0,2	0,0	0,0	15	-	+
VIA14	0,0	0,0	50,0±0,2	0,0	0,0	15	+	+
VIA15	0,0	0,0	32,0±0,0	0,0	0,0	16	+	-
VIA16	0,0	0,0	40,0±0,0	0,0	0,0	17	+	-
VIIA17	0,0	0,0	0,0	0,0	41,2±0,2	20	+	+
VIIA18	0,0	56,7±0,3	0,0	0,0	0,0	21	+	-
VIIA19	0,0	44,0±0,0	65,2±0,2	0,0	23,5±0,1	18	+	+
VIIA20	0,0	20,0±0,1	0,0	21,8±0,2	0,0	18	+	+
VIIA21	0,0	0,0	0,0	0,0	37,5±0,3	22	+	-
VIIA22	0,0	0,0	0,0	0,0	31,3±0,4	24	+	-
VIIIA23	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15	-	-
VIIIA24	50,0±0,2	0,0	0,0	60,0±0,0	35,0±0,0	18	-	+
VIIIA25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	21	+	-
IXA26	50,0±0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	19	-	-
IXA27	0,0	0,0	60,0±0,0	0,0	18,2±0,2	17	+	+
XA28	0,0	0,0	60,0±0,0	0,0	0,0	16	+	-
XA29	0,0	0,0	33,3±0,3	0,0	33,3±0,3	18	+	+

Halo de inhibición= solo se consideran positivas a aquellas cepas con halo de inhibición mayor de 5 mm

*PICR = (R1 – R2)/R1 x 100. Donde R1 y R2 son los radios mayor y menor respectivamente de crecimiento radial

Tabla 19. Tratamientos a base de cepas del género *Bacillus* y *Azotobacter*

Código	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
Cepas	IIB4	IIIB6	VB10	VB11	VIIB16	IXB20	XB23
	IIIA5	IVA7	VIIIA24	VA12	VIIA19	IVA7	IVA7

Tabla 20. Evaluación de la capacidad promotora de crecimiento vegetal a nivel de almácigo.

bioinoculante	Semillas	Suelo	Tiempo de germinación de semillas(días)	Número de hojas	Altura del tallo (cm)	Síntomas de micosis
B1	inoculadas	estéril	13	8	35	No presenta
	no inoculadas	no estéril	13	8	30	No presenta
		estéril	15	5	23	No presenta
B2		no estéril	15	5	22	Presenta
	inoculadas	estéril	12	8	27	No presenta
		no estéril	12	6	26	No presenta
	no inoculadas	estéril	15	4	22	No presenta
B3		no estéril	15	4	22	Presenta
	inoculadas	estéril	11	7	28	No presenta
		no estéril	11	7	28	No presenta
	no inoculadas	estéril	15	5	24	No presenta
		no estéril	15	5	24	Presenta
B4	inoculadas	estéril	14	8	29	No presenta
		no estéril	14	7	29	No presenta
	no inoculadas	estéril	15	5	24	No presenta
B5		no estéril	15	4	24	Presenta
	inoculadas	estéril	13	7	30	No presenta
		no estéril	13	7	29	No presenta
	no inoculadas	estéril	15	5	22	No presenta
		no estéril	15	5	23	Presenta
B6	inoculadas	estéril	11	9	34	No presenta
		no estéril	11	9	34	No presenta
	no inoculadas	estéril	15	5	22	No presenta
B7		no estéril	15	4	23	Presenta
	inoculadas	estéril	12	9	31	No presenta
		no estéril	12	9	30	No presenta
	no inoculadas	estéril	15	5	24	No presenta
		no estéril	15	5	24	Presenta

ANEXO 2: FIGURAS



Figura 1. Campo de cultivo de mango, lugar de muestreo, afectado por “muerte regresiva”



Figura 2: Muestra de suelo de rizosfera recolectada en bolsa ciplox



Figura 3: Colonias de las cepas puras de *Bacillus sp* aisladas.

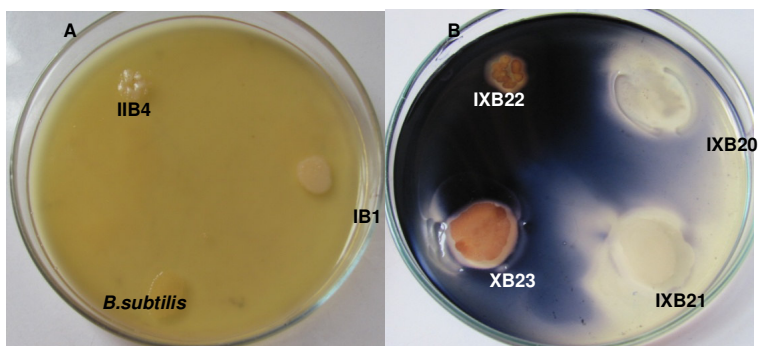


Figura 4. Prueba de la lecitinasa (A) y Prueba de la degradación de almidón (amilasa) (B).

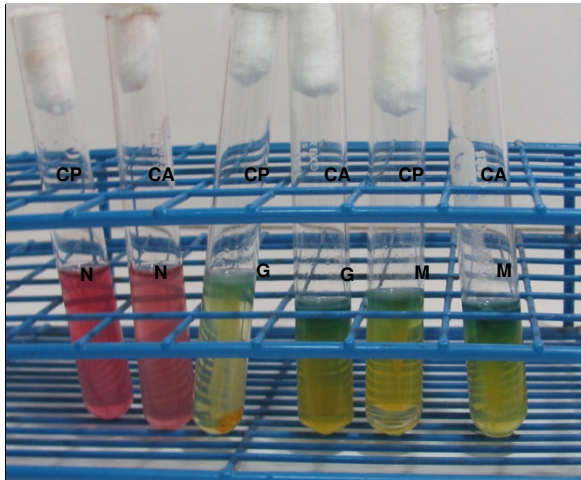


Figura 5. Prueba de reducción de nitrato (N), degradación de glucosa (G) y manitol (M), realizada a una de las cepas aislada (CA) *Bacillus sp.* y a la cepa patrón (CP) *Bacillus subtilis*.

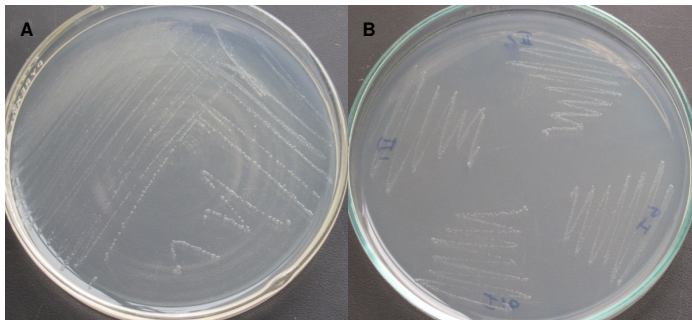


Figura 6. Colonias de cepas *Azotobacter sp* (A) y de cepa testigo *Azotobacter vinelandi* (B).

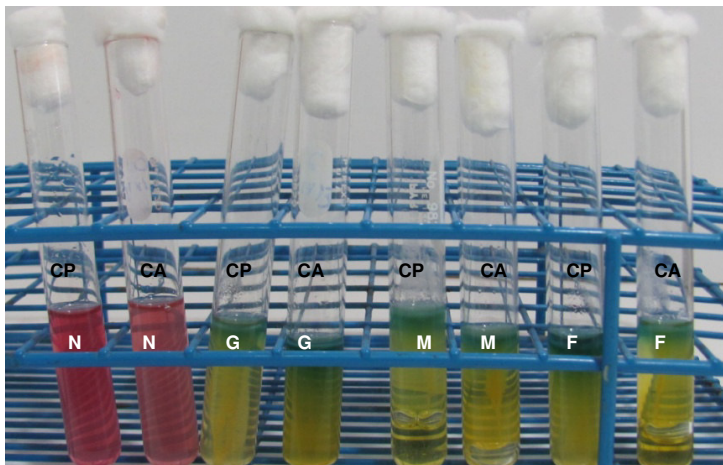


Figura 7. Prueba de reducción de nitrato (N), degradación de glucosa (G), maltosa (M), fructosa (F), realizada a una de las cepas aislada (CA) de *Azotobacter sp.* y a la cepa patrón (CP) de *Azotobacter vinelandi*.

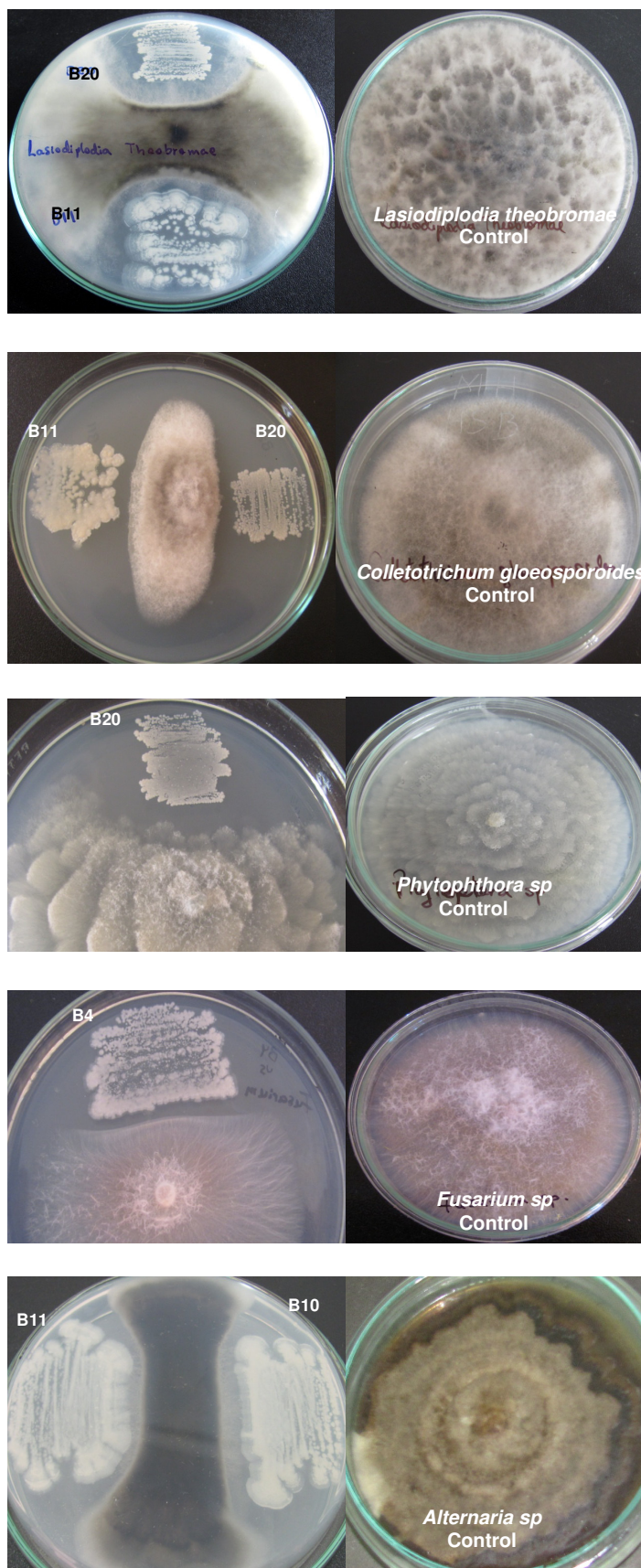


Figura 8. Prueba de antagonismo de las cepas aisladas del género *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de mango.

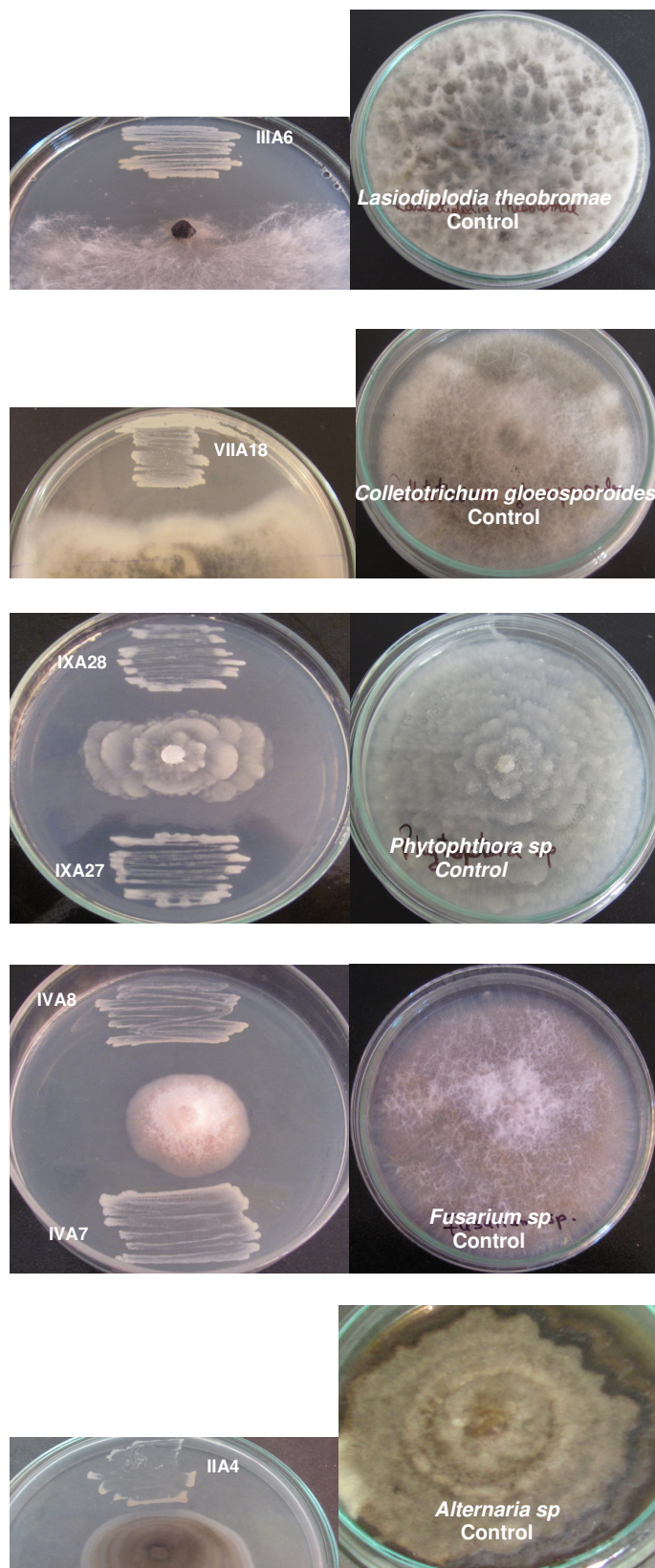


Figura 9. Prueba de antagonismo de las cepas aisladas del género *Azotobacter* frente a hongos fitopatógenos de mango.

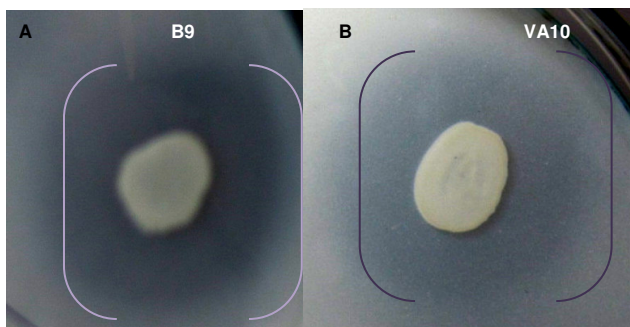


Figura 10. Prueba de Solubilización de fosfatos cepa del género *Bacillus* (A) y cepa del género *Azotobacter* (B).

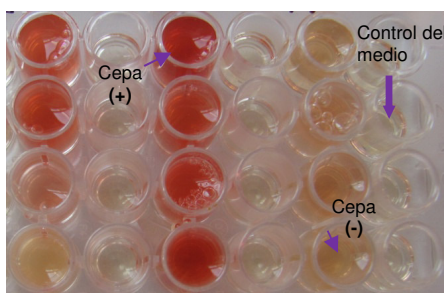


Figura 11. Prueba de producción de ácido indol acético.

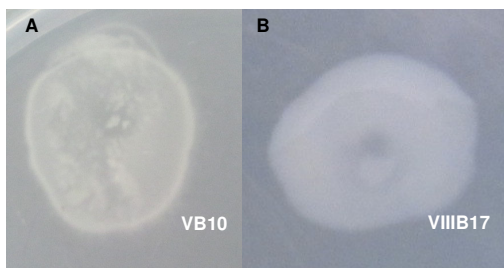


Figura 12. Prueba de Capacidad Potencial de Fijación de Nitrógeno, cepa del género *Bacillus* (A) y cepa del género *Azotobacter* (B).

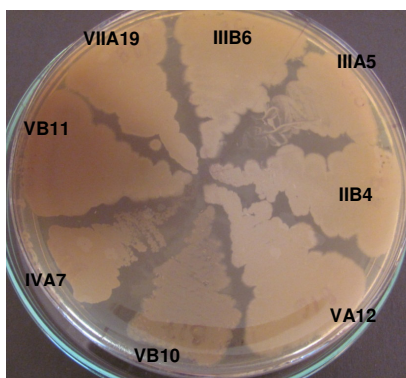


Figura 13. Cepas del género *Bacillus* y *Azotobacter* seleccionadas por sus mejores resultados que no muestran antagonismo entre sí.



Figura 14. Esterilización del suelo de cultivo mediante solarización.

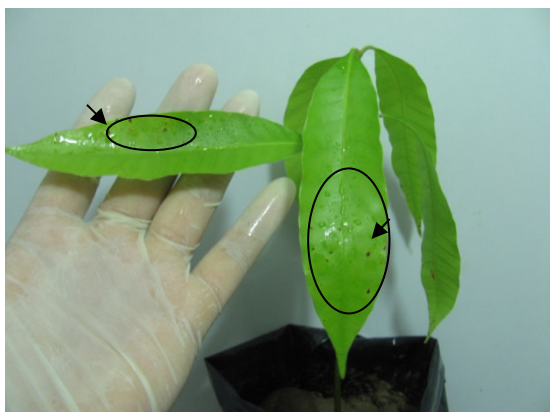


Figura 15. Planta de mango presentando síntomas de micosis.



Figura16. Plantas de mango de semillas inoculadas con los bioinoculantes, sin síntomas de micosis.

ANEXO 3: MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

1. AGAR NUTRITIVO*

Componentes	g/L
Extracto de carne	1,0
Extracto de levadura	2,0
Peptona	5,0
Cloruro sódico	5,0
Agar	15,0
Agua destilada	1000 ml
pH 7	

*Medio de cultivo para aislar y caracterizar fenotípicamente *Bacillus*

2. CALDO MINERAL SIN NITROGENO*

Componentes	g/L
K ₂ HPO ₄	0,655
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20
NaCl	0,02
CaCl ₂	0,01
Cl ₃ Fe (0.1% en solución)	3,40 mL
NaMoO ₄ (H ₂ O)	0,0108
KH ₂ PO ₄	0,15
Manitol	10,0
Sacarosa	10,0
Azul de bromotimol (5% en solución)	5,0 mL
Agua destilada	1000,0 mL
pH 7	

*Medio de cultivo para aislar *Azotobacter*

3. AGAR ASHBY GLUCOSA*

Componentes	g/L
Glucosa	5,0
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005
NaCl	0,2
CaCl ₂ ·H ₂ O	0,2
Agar	15,0
pH 7	

*Medio de cultivo para aislar *Azotobacter*

4. AGAR TRIPTICASA SOYA (TSA) *

Componentes	g/L
Trypticase	17,0
Peptona	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5
Dextrosa	2,50
Agua destilada	1000 ml
Agar	15,0
pH 7	

*Medio de cultivo para aislar y caracterizar fenotípicamente *Azotobacter*

5. CALDO TRIPTICASA SOYA (TSB) *

Componentes	g/L
Trypticasa	17,0
Peptona	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5
Dextrosa	2,50
Agua destilada	1000 ml
pH 7	

*Medio de cultivo para reactivación de cepas de *Bacillus* y *Azotobacter*

6. AGAR PAPA DEXTROSA (APD) *

Componentes	g/L
Infusión de papa (200g de papa)	4,0 ml
D-glucosa	20,0
Agar	15,0
Agua destilada	1000 ml
pH 5,6±0,1	

*Medio de cultivo para la prueba de antagonismo

7. SOLUCIÓN DE SALKOWSKY*

2% de FeCl₃ 0,05M en 35% de Ácido Perclórico

*Reactivo usado en la prueba de producción de ácido indol acético

8. AGAR PICOVSKAYA*

Componentes	g/L
Extracto de levadura	0,5
Dextrosa	10,0
Fosfato de calcio	5,0
Sulfato de amonio	0,5
Cloruro de potasio	0,2
Sulfato de magnesio	0,001
Sulfato de fierro	0,001
Agar	18,0
pH 7	

*Medio de cultivo para la prueba de solubilización de fosfatos

9. MEDIO SELECTIVO PARA NFB*

Componentes	g/L
KH ₂ PO ₄	0,2
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
CaSO ₄	0,1
MoO ₃	0,001
Sacarosa	5,0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,04
Agar	15,0
Agua destilada	1000,0 ml
Azul de Bromotimol	0,5
pH 7.6	

*Medio de cultivo selectivo para asilar bacterias fijadoras de N₂.